

ENTWICKLUNG RADIOIMMUNOLOGISCHER METHODEN
ZUR BESTIMMUNG VON OPIUMALKALOIDEN
IN PAPAVER-PFLANZEN UND -ZELLKULTUREN

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Ute Wieczorek
aus
Bochum

Januar 1985

1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk

2. Referent: Doz. Dr. J. Stöckigt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.85

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	18
1. Pflanzliches Material	18
1.1. Herkunft und Anzucht der Pflanzen	18
1.2. Herkunft des Herbarmaterials	19
1.3. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial	19
2. Zellkulturtechniken	20
2.1. Herkunft der Zellkulturen	20
2.2. Medien	21
2.3. Sterilisationsverfahren	21
2.4. Anlage und Kultivierung von Kalluskul- turen	22
2.5. Anlage, Kultivierung und Plattierung von Suspensionskulturen	22
2.6. Immobilisierung von Zellsuspensions- kulturen	24
2.7. Aufarbeitung von Zellkultur-Material .	25
3. Reagenzien	26
3.1. Chemikalien	26
3.2. Lösungen	27
4. Geräte	28
5. Synthesen	29
5.1. Synthese von (S)- und (R)-Norretiku- lin-N- β -Propionsäure	29
5.2. Synthese von Salutaridin-7-(O-carboxy- methyl)oxim	30
5.3. Darstellung von Northebain	31
5.4. Darstellung von Northebain-N- β -Pro- pionsäure	31
5.5. Synthese von Norcodein	33
5.6. Synthese von Norcodein-N- β -Propion- säure	34

	Seite
5.7. Synthese von Normorphin	34
5.8. Synthese von Normorphin-N- β -Propion- säure	35
5.9. Kopplung der Propionsäure-Derivate von Northebain, Norcodein und Normorphin an Rinderseumalbumin	35
5.10. Darstellung von (S)- und (R)-(NC^3H_3)- Retikulin	37
5.11. Synthese von Salutaridinol I und II ..	38
6. Chromatographische Verfahren	38
7. Erzeugung von Antikörpern	41
8. Durchführung der Radioimmuntests	43
9. Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse .	44

III. ERGEBNISSE

1. Aufbau eines Radioimmuntests für (S)- und (R)-Retikulin	46
1.1. Darstellung von (S)- und (R)-Retiku- lin-Konjugaten zur Erzeugung spezifi- scher Antikörper	46
1.2. Wahl geeigneter Testbedingungen	49
1.3. Eigenschaften der (S)- und (R)-Reti- kulin-Antiseren	55
1.4. Standardisierung der Tests	58
2. Aufbau des Salutaridin-Radioimmuntests	61
2.1. Kopplung von Salutaridin-7-(O-carboxy- methyl)Oxim an BSA	61
2.2. Synthese von (7- ^3H)-Salutaridinol I und II	64
2.3. Wahl geeigneter Testbedingungen	67
2.4. Charakterisierung des Salutaridin- Antiserums	70
2.5. Standardisierung des Salutaridin- Radioimmuntests	72

	Seite
3. Entwicklung eines Radioimmuntests für Thebain	74
3.1. Synthese von (7- ³ H)-Thebain	74
3.2. Optimierung der Testbedingungen	75
3.3. Charakterisierung des Thebain-Antisera	76
3.4. Standardisierung des Tests	79
4. Aufbau von Radioimmuntests für Codein und Morphin	81
4.1. Synthese von (6- ³ H)-Codein	81
4.2. Eigenschaften der Codein- und Morphin-Antisera	83
4.3. Standardisierung der Radioimmuntests	84
5. Zusammenfassung der wichtigsten Testparameter	87
6. Untersuchungen zur Spezifität der Radioimmuntests	89
6.1. Bestimmung von Kreuzreaktionen	90
6.2. Verteilung von immunreaktivem Material in dem HPLC-Eluat eines <u>Papaver somniferum</u> -Pflanzenextraktes	102
6.3. Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurven	106
7. Untersuchungen zum Vorkommen der Opiumalkaloide in differenzierten Pflanzen	110
7.1. Bestimmung von Opiumalkaloiden in Herbarmaterial von <u>Papaver</u> -Arten	110
7.2. Bestimmung der Opiumalkaloide in Pflanzen verschiedener <u>Papaver</u> -Arten	137
7.3. Selektionsuntersuchungen an <u>Papaver somniferum</u> -Pflanzen verschiedener <u>Herkünfte</u>	146
7.4. Bildung der Opiumalkaloide während der Keimung von <u>Papaver somniferum</u> ..	162
7.5. Vorkommen von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin und Salutaridin in Herbarmaterial von <u>Croton</u> -Arten	170

	Seite
8. Untersuchungen zum Vorkommen der Opiumalkaloide in pflanzlichen Zellkulturen	177
8.1. Bestimmung von (S)- und (R)-Retikulin in Kalluskulturen verschiedener Pflanzen	177
8.2. Untersuchungen zur Produktion von Morphinan-Alkaloiden in pflanzlichen Zellkulturen von <u>Papaver</u>	189
8.2.1. Bestimmung von Thebain, Codein und Morphin in Kalluskulturen von <u>Papaver</u>	190
8.2.2. Untersuchungen zur Steigerung des Thebain-Gehaltes einer Suspensionskultur von <u>Papaver somniferum</u>	193
8.2.2.1. Einfluß unterschiedlicher Medien	194
8.2.2.2. Abhängigkeit der Thebain-Bildung von der Saccharose-Konzentration	199
8.2.2.3. Auswirkung von Wuchsstoffen auf die Thebain-Produktion	204
8.2.3. Thebain-, Codein- und Morphin-Gehalt in varianten Zellstämmen von <u>Papaver somniferum</u> /P049 ...	212
8.3. Untersuchungen zur Biotransformation applizierter Alkaloid-Vorstufen durch eine Suspensionskultur von <u>Papaver somniferum</u>	215
8.4. Biotransformation von (R)-Retikulin durch immobilisierte Pflanzenzellen von <u>Papaver somniferum</u>	224
IV. DISKUSSION	230
V. ZUSAMMENFASSUNG	251
VI. LITERATURVERZEICHNIS	256

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (1 Ci = $2,2 \times 10^{12}$ Zerfälle pro Minute)
cpm	Zählrate (counts per minute)
EDC	1-Ethyl-3(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid
FG	Frischgewicht
h	Stunden
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
KR	Kreuzreaktion
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NWG	Nachweisgrenze
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v	Volumen
w	Gewicht
Upm	Umdrehungen pro Minute

I. E I N L E I T U N G

Der Schlafmohn (Papaver somniferum L.) ist eine der ältesten Nutz- und Arzneipflanzen der Menschheit. Die Pflanzenart scheint vor einigen tausend Jahren im westlichen Mittelmeerraum entstanden zu sein (SCHULTZE-MOTEL, 1979). Aufgrund von Mohnkapselfunden in der Umgebung von 4000 Jahre alten Pfahlbauten in der Schweiz läßt sich die Verwendung von Mohnsamen als Nahrungsmittel bis in die Steinzeit zurückverfolgen (KROEBER, 1946). Etwa 400 Jahre v.u.Z. beschrieb Hippokrates die medizinische Verwendung von Mohnblättern und -früchten bzw. hieraus gewonnener Säfte. Kenntnisse über die Zubereitung und den Gebrauch von Opium, dem eingetrockneten Milchsaft der Mohnfrucht, erhielten die Griechen wahrscheinlich erst während Alexanders Feldzug nach Indien (etwa 320 Jahre v.u.Z.). Von Nikander von Kolophon in Indien (200 Jahre v.u.Z.) ist eine spezielle Beschreibung der gefährlichen Wirkungsart des Opiums überliefert (vgl. PFEIFFER, 1962a). Aufgrund seiner narkotischen und analgetischen Wirkung wurde das Opium seitdem jahrtausendlang als Arzneimittel bei verschiedensten Indikationen eingesetzt (DUKE, 1973).

Im Jahre 1806 entdeckte der deutsche Apothekergehilfe Friedrich Wilhelm Sertürner auf der Suche nach dem "principium somniferum" den Hauptinhaltsstoff des Opiums, das Alkaloid Morphin (SERTÜRNER, 1817). Diese erste Isolierung einer organischen Base aus einer Pflanze bildete den Ausgangspunkt für die Entwicklung der Alkaloidchemie einerseits und die Erforschung der weiteren Bestandteile des Opiums andererseits. Es schloß sich die Entdeckung von Narkotin (ROBIQUET, 1817), Codein (ROBIQUET, 1832), Narcein und Thebain (PELLETIER, 1835), Papaverin (MERCK, 1848) und Neopin (DOBBIE und LAUDER, 1911) in Opium an. Parallel zu den Isolierungen der



Pflanzenbasen wurden einfache chemische Umsetzungen der Alkaloide durchgeführt, beispielsweise die Acetylierung von Morphin zu Heroin (WRIGHT, 1874) oder die Methylierung von Morphin zu Codein (GRIMAU, 1881). Darüber hinaus wurde die elementare Zusammensetzung der Substanzen bestimmt. Für Morphin gab LAURENT 1847 erstmals die Summenformel richtig an.

Diese Untersuchungen bildeten eine wichtige Voraussetzung für die Aufklärung der Alkaloidstrukturen. 1925 wurde von GULLAND und ROBINSON die Konstitution von Thebain, Codein und Morphin postuliert. Ihre Vorstellungen konnten erst in den 50er Jahren dieses Jahrhunderts durch die erste totalsynthetische Darstellung von natürlichem Codein und Morphin (GATES und TSCHUDI, 1952, 1956) bestätigt werden. Die relative Stereochemie des Morphins wurde zunächst mit chemischen Methoden ermittelt (HOLMES, 1952) und 1955 von MACKAY und HODGKIN durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt; seine absolute Konfiguration wurde im selben Jahr bestimmt (KALVODA et al., 1955) (vgl. Abb. 1).

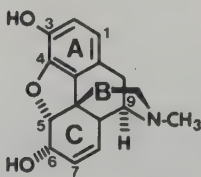


Abb. 1: Strukturformel des Morphins

Im Zusammenhang mit den Postulaten zur Struktur der Morphinan-Alkaloide wurden auch erste Spekulationen über ihre Entstehung in der Pflanze geäußert. GULLAND und ROBINSON (1925) erkannten die strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen Verbindungen und den 1-Benzylisochinolin-Alkaloiden und

schlossen auf ihre biogenetische Verwandtschaft; eine entsprechende Vermutung hatten bereits 1910 WINTERSTEIN und TRIER geäußert. Darüber hinaus postulierten diese Autoren erstmals die biogenetische Abstammung der Benzylisochinoline von aromatischen Aminosäuren (WINTERSTEIN und TRIER, 1910). Nach Vorstellungen von BARTON und COHEN (1957) sollte das Morphinan-Skelett durch intramolekulare Kopplung phenolischer Radikale aus Benzylisochinolin-Alkaloiden gebildet werden.

Eine Überprüfung dieser biosynthetischen Vorstellungen wurde erst in den fünfziger Jahren möglich, als organische Moleküle in radioaktiv markierter Form verfügbar wurden und somit Fütterungsexperimente mit Papaver somniferum durchgeführt werden konnten. In ersten Versuchen wurde ^{14}C -markiertes Tyrosin ganzen Pflanzen oder Pflanzenteilen appliziert. Es konnte nachgewiesen werden, daß pro Molekül Thebain, Codein oder Morphin jeweils zwei Tyrosinmoleküle eingebaut werden (BATTERSBY und HARPER, 1958; LEETE, 1958, 1959; KLEINSCHMIDT und MOTHES, 1959; BATTERSBY et al., 1960). Weitere Experimente bestätigten, daß (1- ^{14}C)-Dopamin, das bereits 1955 von ROBINSON als biogenetische Vorstufe postuliert worden war, in die Morphin-Alkaloide eingebaut wurde. Der Abbau der radioaktiven Substanzen zeigte daneben, daß Dopamin nur den Isochinolinteil des Morphinskeletts aufbauen kann (BATTERSBY und FRANCIS, 1964; LEETE und MURRILL, 1964). Der Einbau von ^{14}C -markiertem Norlaudanosolin in Thebain, Codein oder Morphin bestätigte die Spekulation, daß diese Alkaloide sich von den Benzylisochinolin ableiten lassen (BATTERSBY und BINKS, 1960; BATTERSBY et al., 1964). Kinetische Untersuchungen nach Applikation von $^{14}\text{CO}_2$ (RAPOPORT et al., 1960) und (2- ^{14}C)-Tyrosin (BATTERSBY und HARPER, 1960) sowie Fütterungen von radioaktiv markiertem Thebain, Codein und Morphin (KLEINSCHMIDT, 1960; STERMITZ und RAPOPORT, 1961 a,b) ließen den Schluß zu, daß Thebain das zunächst gebildete Morphinalkaloid ist; es wird im weiteren Verlauf der Biosyn-

these zu Codein umgesetzt, welches wiederum zu Morphin demethyliert werden kann. Es war deshalb zu erwarten, daß die Benzylisochinolin-Vorstufe, die biogenetisch zwischen Norlaudanolin und Thebain liegen mußte, eine N- und zwei O-Methylgruppen im Molekül aufweisen sollte. Diese Strukturmerkmale besitzt das Alkaloid Retikulin, das erstmals 1959 von GOPINATH et al. aus der Wurzelrinde von Anona reticulata isoliert wurde. Sein Substitutionsmuster gestattet eine oxidative Kopplung nach dem von BARTON und COHEN (1957) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus. Tatsächlich bestätigen Fütterungsversuche mit ^{14}C - und ^3H -markiertem Retikulin eindeutig, daß diese Verbindung eine biosynthetische Vorstufe der Morphin-Alkaloide darstellt (BARTON et al., 1963, 1965b; BATTERSBY et al., 1963, 1964).

Retikulin besitzt in Position 1 ein asymmetrisches C-Atom, das dem Chiralitätszentrum C9 des Morphins entspricht (vgl. Abb. 2). Aus Anona reticulata war zunächst das (S)-Enantiomer der Verbindung gewonnen worden. Später wurde über das Vorkommen von beiden enantiomeren Formen in Papaver somniferum berichtet (BROCHMANN-HANSSSEN und FURUYA, 1964; BATTERSBY et al., 1965a; BROCHMANN-HANSSSEN und NIELSEN, 1965). Nachdem die ersten Fütterungsexperimente mit razemischem Retikulin durchgeführt worden waren, wurden 1965 von BATTERSBY et al. erstmals die optisch reinen Formen mit einer ^3H -Markierung am C-Atom 1 und mit ^{14}C -Markierungen an drei weiteren Positionen des Moleküls eingesetzt. Es zeigte sich, daß beide Enantiomere des Retikulins in das Morphin-Skelett inkorporiert werden, daß die Metabolisierung des (S)-Retikulins aber mit einem deutlich höheren Tritiumverlust behaftet war als die der (R)-Form. Battersby schloß aus diesen Befunden, daß das (S)-Retikulin über ein reversibles Oxidations-Reduktions-System, mit 1,2-Dehydroretikulin als Zwischenstufe, in (R)-Retikulin überführt wird. Diese Verbindung besitzt eine mit Morphin übereinstimmende Konfiguration am C-Atom 1 und

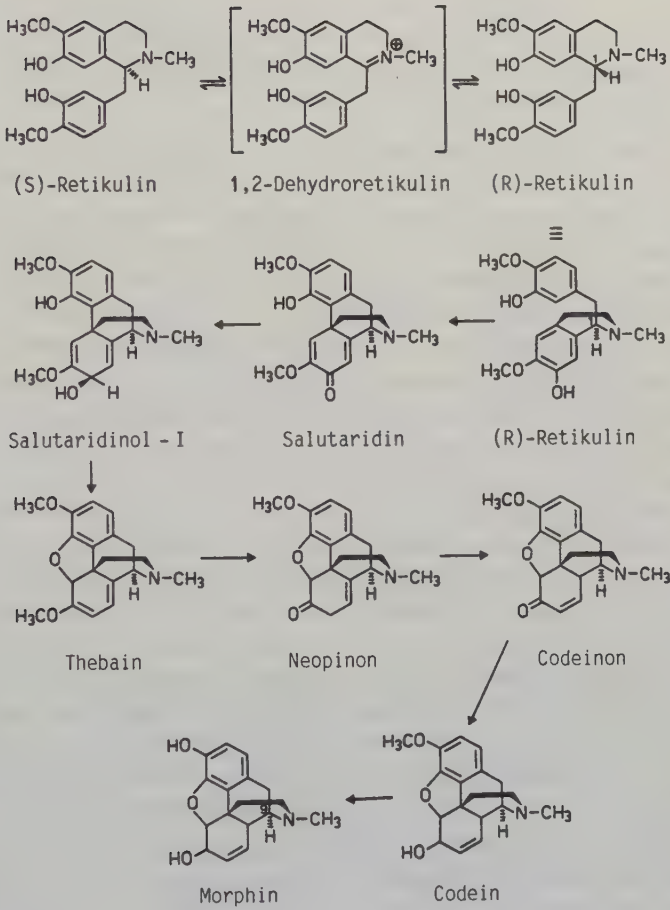


Abb. 2: Biosynthese des Morphins, verändert nach CORDELL (1981).

stellt somit die eigentliche Vorstufe der Morphin-Alkaloide dar (vgl. Abb. 2). Es zeigte sich, daß 1,2-Dehydroretikulin in das Morphingerüst eingebaut wird (BATTERSBY et al., 1965b; BORKOWSKI et al., 1978) und daß es natürlich im Schlafmohn vorkommt (BORKOWSKI et al., 1978).

Wenn das Alkaloid Retikulin nach der von BARTON und COHEN (1957) postulierten Phenoloxidation umgesetzt würde, sollte ein Reaktionsprodukt mit einer Dienonstruktur resultieren. Eine solche Verbindung war erstmals 1964 von Barnes aus der Euphorbiacee Croton salutaris isoliert und Salutaridin benannt worden (vgl. BARTON et al., 1965b). Salutaridin zeigte einen guten Einbau in Thebain, Codein und Morphin, und sein natürliches Vorkommen in Papaver somniferum konnte durch Verdünnungsanalysen demonstriert werden (BARTON et al., 1965b). Durch Reduktion von Salutaridin entstehen in vitro die beiden epimeren Alkohole Salutaridinol I und II. Fütterungsversuche mit den beiden Isomeren zeigten, daß nur das Salutaridinol I die richtige Stereochemie für eine in vivo-Metabolisierung zu Thebain, Codein und Morphin besaß (BARTON et al., 1965b). Für die weitere Umsetzung des Thebains postulierten BARTON und COHEN (1957) eine Reaktionssequenz über Neopinon und Codeinon zum Codein. Ihre Vermutung fand Unterstützung durch den Befund, daß Neopinon und Codeinon in Codein und Morphin eingebaut werden. Ferner konnte das natürliche Vorkommen dieser Substanzen in Papaver somniferum durch Isotopenverdünnungs-Analysen bestätigt werden (BATTERSBY et al., 1967; BLASCHKE et al., 1967; PARKER et al., 1972). Ein Schema für die Biosynthese des Morphins, das sich aus den genannten Fütterungsexperimenten ergibt, ist in Abbildung 2 dargestellt.

Erst in allerjüngster Zeit ist eine Arbeit erschienen, die eine alternative Sequenz für die letzten Schritte der Morphin-Biosynthese aufzeigt (BROCHMANN-HANSEN, 1984): Ausgehend von Thebain kann Morphin über die Zwischenstufen Oripavin und Morphinon gebildet werden (Abb. 3). Dies demon-

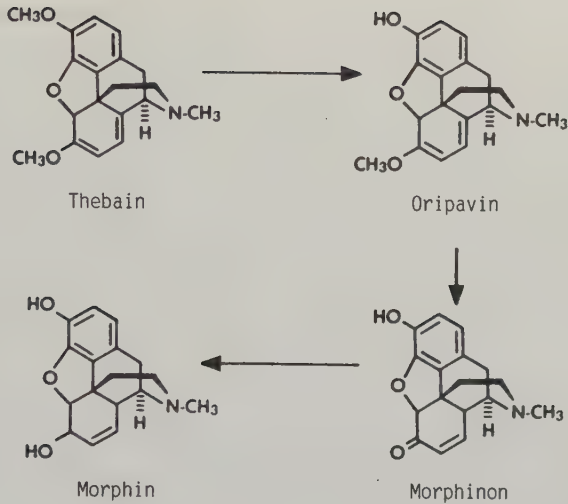


Abb. 3: Einbau von Thebain in Morphin über Oripavin und Morphinon (nach BROCHMANN-HANSEN, 1984).

strierten Fütterungsexperimente von radioaktivem Oripavin an Papaver somniferum-Pflanzen, bei denen ein Einbau der Substanz in Morphinon und Morphin festgestellt wurde (BROCHMANN-HANSEN, 1984). Darüber hinaus konnte das Vorkommen von Oripavin im Schlafmohn nachgewiesen werden (NIELSEN et al., 1983).

Trotz der Identifizierung der Zwischenstufen der Morphin-Biosynthese mit Hilfe von in vivo-Experimenten ist über die Enzymsysteme, die ausgehend vom (S)-Retikulin, die einzelnen Reaktionsschritte katalysieren, bislang nur sehr wenig bekannt. 1978 wiesen FURUYA et al. die Reduktion von Codeinon zu Codein durch zellfreie Rohextrakte einer Kalluskultur von Papaver somniferum nach. Daneben konnte dieser Reaktions-

schritt (HODGES und RAPOPORT, 1980) sowie die Oxidation von (R,S)-Retikulin zu Salutaridin (HODGES und RAPOPORT, 1982a) in vitro mit Rohextrakten aus ganzen Pflanzen vom Schlafmohn durchgeführt werden. 1982 berichtete schließlich AMANN über die Isolierung eines Enzyms aus Zellkulturen von Berberis wilsoniae, das (S)-Retikulin und (S)-Norretikulin zu den entsprechenden 1,2-Dehydroverbindungen umsetzt. Inwieweit diese Reaktion allerdings der physiologischen Rolle dieses Enzyms entspricht, ist bislang fraglich, da es außerdem sehr effizient (S)-Tetrahydroprotoberberine zu Protoberberinalkaloiden oxidieren kann (AMANN et al., 1984).

Unter den bislang aus Opium isolierten etwa 40 verschiedenen Alkaloiden (CORDELL, 1981) besitzen Thebain, Codein und Morphin eine herausragende Bedeutung in der pharmazeutischen Industrie. Morphin wird als Analgeticum bei starken Schmerzen eingesetzt. Es weist außerdem euphorische Effekte auf, auf die die Suchtgefahr und sein Mißbrauch als Rauschmittel zurückzuführen sind (FORTH et al., 1977). Daneben dient es als Ausgangsverbindung für die Darstellung von Codein und einiger partialsynthetischer Abwandlungsprodukte, z. B. Ethylmorphin oder Hydromorphin, (SCHUNACK et al., 1983). Etwa 90 % des gewonnenen Morphins werden heute in andere Verbindungen überführt (NYMAN und BRUHN, 1979). Bei der medizinischen Anwendung von Codein steht die antitussive Wirkung im Vordergrund; seine analgetische Wirkung ist wesentlich schwächer als die von Morphin, auch ist die Suchtgefahr geringer, was dazu geführt hat, daß sich das pharmazeutische Interesse mehr und mehr vom Morphin zum Codein verlagert hat (SCHUNACK et al., 1983). Thebain besitzt selbst keine therapeutische Bedeutung, da es sehr viel toxischer als Morphin ist und nur eine schwache analgetische Wirkung aufweist (PREININGER, 1975). Es wird allerdings, ebenso wie Morphin, für die Synthese von Codein und einiger partialsynthetischer Analgetika oder Morphin-Antagonisten benötigt, z. B. Oxycodon,

Thebacon, Hydrocodon oder Dihydrocodein (SCHUNACK et al., 1983; SZANTAY et al., 1983).

Die pharmakologischen Eigenschaften von Morphin und Codein führten zu einem ständig steigenden Bedarf an diesen Alkaloiden; im Jahr 1972 wurden weltweit etwa 170 Tonnen Morphin und 200 Tonnen Codein produziert (CORDELL, 1981). Eine totalsynthetische Darstellung der Morphinan-Alkaloide ist bis heute nicht ökonomisch durchzuführen (SZANTAY et al., 1983), so daß die Substanzen aus Naturprodukten isoliert werden müssen. Lange Zeit war Opium die alleinige Quelle für die industrielle Gewinnung von Morphin, Codein und Thebain (TROJANEK et al., 1965). Eine Wende trat ein, als zu Beginn der dreißiger Jahre in Ungarn eine Methode patentiert und angewendet wurde, nach der die Alkaloide aus den trockenen oberirdischen Teilen des Schlafmohns, insbesondere aus den Kapseln, ökonomisch extrahiert werden können (KABAY, 1930). Dieses Verfahren hat zunehmende Bedeutung erlangt, so daß 1971 bereits 37 % des insgesamt produzierten Morphins aus dem sogenannten "Mohnstroh" gewonnen wurden (FAIRBAIRN, 1976).

Der ansteigende Mißbrauch von Opiaten hat es notwendig gemacht, nach Rohmaterialien zu suchen, die alternativ zu Papaver somniferum von der pharmazeutischen Industrie zur Gewinnung von Codein und Morphin genutzt werden können. Eine Möglichkeit ergab sich aus systematischen Studien der Gattung Papaver (vgl. BÜHM, 1981). Während von über 100 bekannten Papaver-Arten nur P. somniferum und die nahverwandte Art P. setigerum zur Bildung von Codein und Morphin befähigt sind, gibt es weitere Arten, die die Biosynthese des Morphins bis zu der Zwischenstufe Thebain durchführen können (vgl. Abb. 2). 1963 berichteten NEUBAUER und MOTHES über einen Stamm von Papaver bracteatum, der in seinen Wurzeln 0,7 - 1,3 % Thebain und nur Spuren anderer Alkaloide enthält. An diese Entdeckung schlossen sich intensive Studien von P. bracteatum an, die sich mit physiologischen, agrartechnischen

und züchterischen Problemstellungen beschäftigten, um eine rentable Produktion von Thebain zu erreichen (NYMAN und BRUHN, 1979; BÜHM, 1980). Ein besonders hoher Gehalt an Thebain konnte bei einer aus Iran stammenden Population von Papaver bracteatum (Arya II) erzielt werden, die in ihren getrockneten Kapseln 3,5 % des Alkaloids enthielt. Es kann darüber hinaus durch einmaliges Umkristallisieren des extrahierten Rohmaterials in reiner Form gewonnen werden, da keine weiteren Alkaloide in der Pflanze auftreten (LALEZARI et al., 1974).

Außer in Papaver bracteatum ist Thebain auch in Papaver orientale, P. pseudo-orientale (PHILLIPSON et al., 1981a), P. fugax (PHILLIPSON et al., 1973), P. armeniacum (PHILLIPSON, 1973), P. cylindricum, P. persicum und P. triniifolium (PHILLIPSON, 1983) nachgewiesen worden.

Eine andere Substanz, die für eine Gewinnung der Opiumalkaloide benutzt werden könnte, ist das Morphinandienon Salutaridin (vgl. Abb. 2); es kann chemisch sehr einfach in zwei Schritten in Thebain überführt werden (BARTON et al., 1965b). Die Fähigkeit zur Biosynthese dieser Substanz besitzen nicht nur Pflanzen der Gattung Papaver, sondern auch Vertreter anderer Gattungen und Familien. Salutaridin wurde bereits aus mehreren Croton-Arten (CHAMBERS et al., 1966; STUART und WOO-MING, 1969; BARNES und SOEIRI, 1981), aber auch aus Glaucium flavum (LALEZARI et al., 1976; SHAFIEE et al., 1977) und Glaucium vitellinum (SHAFIEE und GHANBARPOUR, 1979) isoliert. Dies zeigt, daß neue Möglichkeiten für eine Gewinnung der Morphinan-Alkaloide durch eine weitgefächerte Untersuchung von Pflanzen-Inhaltsstoffen erschlossen werden könnten.

Eine Alternative zur Isolierung der Opium-Alkaloide aus differenzierten Pflanzen könnte die Gewinnung der Substanzen mit Hilfe pflanzlicher Zellkulturen sein. Eine solche biotechnologische Produktion von Naturstoffen ist jedoch nur dann industriell nutzbar, wenn eine Zelllinie etabliert werden

kann, deren Sekundärstoff-Gehalt mindestens ebenso hoch ist wie der der differenzierten Pflanze. Häufig ist jedoch die Entwicklung einer Gewebekultur mit qualitativen und quantitativen Veränderungen des Sekundärstoff-Metabolismus verbunden; wenn die Bildung eines Inhaltsstoffes an ein bestimmtes Organ der Pflanze oder an ein Entwicklungsstadium gebunden ist, so wird er von der entdifferenzierten Zellkultur nicht mehr produziert (ZENK, 1982). Aufgrund der Totipotenz der Pflanzenzellen, - die durch Regeneration einer Zelle von Daucus carota zu einer intakten Pflanze erstmals 1958 (REINERT; STEWARD et al.) bewiesen wurde -, sind jedoch die Informationen für alle Fähigkeiten der differenzierten Pflanze auch in der Gewebekultur vorhanden. Das Problem besteht demnach darin, die Kultivierungsbedingungen zu finden, unter denen die Blockierung bestimmter Syntheseleistungen in der Zellkultur aufgehoben werden kann, ohne daß gleichzeitig eine morphologische Differenzierung eintritt.

Erste Untersuchungen des Alkaloidspektrums von Papaver somniferum- und Papaver bracteatum-Zellkulturen sind zu Beginn der siebziger Jahre durchgeführt worden. Aus Kallusgewebe, das aus verschiedenen Organen von Mohnpflanzen angelegt worden war, wurden Protopin-, Aporphin- und Benzophenanthridin-Alkaloide isoliert; Morphinane konnten in den analysierten Kulturen jedoch nicht nachgewiesen werden (FURUYA et al., 1972; IKUTA et al., 1974). Spätere Arbeiten berichten über die Bildung von geringen Mengen Thebain durch Gewebekulturen von Papaver bracteatum (SHAFIEE et al., 1976; SHAFIEE et al., 1978; KAMIMURA und NISHIKAWA, 1976; KAMIMURA et al., 1976). Es wurde versucht, durch Variation der Kultivierungsbedingungen eine Steigerung der Thebain-Produktion zu induzieren. Der maximale Gehalt, der erzielt werden konnte, lag jedoch mit 0,013 % des Trockengewichts um den Faktor 10-20 unter dem der differenzierten Pflanze, die zur Anlage der Zellkultur verwendet worden war (KAMIMURA und NISHIKAWA,

1976; KAMIMURA et al., 1976). KHANNA et al. (1978) etablierten eine Suspensionskultur von Papaver somniferum, die Spuren von Thebain, Codein und Morphin produzierte. Die Syntheseleistung der Kultur war darüber hinaus steigerbar, wenn Ascorbinsäure oder die biosynthetische Vorstufe Tyrosin zum Medium gegeben wurden (KHANNA et al., 1978). Eine weitere Suspensionskultur von P. somniferum wies mit 0,15 % des Trockengewichts einen besonders hohen Gehalt an dem Alkaloid Codein auf; die Substanz konnte eindeutig anhand ihres chromatographischen Verhaltens und ihres Massenspektrums identifiziert werden; dagegen waren die Alkaloide Thebain und Morphin in der Kultur nicht vorhanden (TAM et al., 1980; CONSTABEL et al., 1980). Allerdings erwies sich diese Zelllinie als nicht stabil in ihrem Wuchsverhalten; nach mehrjähriger Kultivierung ließ sie sich nicht weiter vermehren und ging schließlich ein (CONSTABEL, pers. Mitteilung). Die Fähigkeit zur Codein-Produktion führen CONSTABEL et al. (1980) auf das Auftreten von sehr großen, polyploiden, differenzierten Zellen in der Gewebekultur zurück. Diese Kopplung der Morphinan-Biosynthese an morphologische Strukturen wird durch weitere Arbeiten belegt, die beschreiben, daß bei der Entwicklung von Embryoiden, Sprossen oder Wurzeln in der Kultur eine Produktion der Alkaloide einsetzt (FURUYA, 1981; STABA et al., 1982; KAMO et al., 1982; ZITO und STABA, 1982; SCHUCHMANN und WELLMANN, 1983; KUTCHAN et al., 1983). Wenn der Metabolismus der Morphinan-Alkaloide einen bestimmten Differenzierungsgrad erfordert, so könnte eine rentable in vitro-Produktion der Substanzen gelingen, wenn eine effiziente Organogenese in der Zellkultur induziert wird. Dies gelang reproduzierbar durch Entfernen der Phytohormone aus dem Kultivierungsmedium (NESSLER, 1982; SCHUCHMANN und WELLMANN, 1983; KUTCHAN et al., 1983). In solchen redifferenzierten Kulturen haben SCHUCHMANN und WELLMANN (1983) einen maximalen Thebain-Gehalt von 0,2 % des Trockengewichts bestimmt; die Konzentra-

tionen der anderen Alkaloide lagen jedoch weit unter diesem Wert.

Eine weitere Möglichkeit, mit Hilfe pflanzlicher Zellkulturen eine biotechnologische Gewinnung von Naturstoffen zu erreichen, besteht darin, sie für eine Biotransformation applizierter Substanzen einzusetzen. Ein bekanntes Anwendungsbeispiel hierfür ist die Hydroxylierung von β -Methyl-digitoxin zu β -Methyldigoxin durch Gewebekulturen von Digitalis lanata (REINHARD und ALFERMANN, 1980). Derartige Experimente können darüber hinaus offenbaren, welche Schritte einer Biosynthesesequenz die Zellkultur durchzuführen in der Lage ist, und an welcher Stelle der Metabolismus durch das Fehlen eines Enzyms blockiert ist.

Über die Biotransformation von Vorstufen der Morphinan-Alkaloide durch Papaver-Gewebekulturen liegen bislang erst wenig Erkenntnisse vor. Die Demethylierung von Thebain zu Codein und Morphin durch eine Papaver somniferum-Zellkultur konnten angeblich 1966 GRÜTZMANN und SCHRÖTER demonstrieren. Ein analoger Versuch mit Kallusgewebe von Nicotiana glauca zeigte überraschenderweise, daß diese Kultur dieselbe Fähigkeit zur Umwandlung des Thebains besaß. Zu einem anderen Ergebnis kamen allerdings FURUYA et al. (1978); weder Thebain noch Codein und Morphin wurden in den von ihnen berichteten Versuchen durch eine Suspensionskultur von Papaver somniferum umgesetzt. Darüber hinaus stellten sie fest, daß nach Applikation von (R,S)-Retikulin (vgl. Abb. 2) das S-Enantiomer zu Tetrahydroprotoberberinen metabolisiert wurde, während das R-Isomer, die Vorstufe des Morphins (vgl. Abb. 2), als optisch reine Verbindung in der Kultur wiedergefunden wurde.

Eine Biotransformation von Codeinon zu Codein konnte bereits mehrfach sowohl mit freien (FURUYA et al., 1978; TAM et al., 1982) als auch mit immobilisierten Papaver somniferum-Zellkulturen (FURUYA et al., 1984) gezeigt werden. Diese

Reaktion, eine stereospezifische Reduktion, ist jedoch vom biotechnologischen Standpunkt aus betrachtet uninteressant, da sie ebenso spezifisch auf chemischem Wege mit Natriumborhydrid durchgeführt werden kann (GATES, 1953).

Die hier dargestellten Arbeiten zeigen, daß aufgrund der bis heute vorliegenden Erkenntnisse weder die Produktions- noch die Biotransformationskapazität von Papaver-Zellkulturen für eine Gewinnung der Morphinan-Alkaloide in industriellem Maßstab auch nur annähernd eingesetzt werden können.

Eine wesentliche Voraussetzung für eine Optimierung der Syntheseleistung pflanzlicher Zellkulturen, aber auch für eine Selektion Alkaloid-produzierender Pflanzen oder den Nachweis der an der Biosynthese des Morphins beteiligten Enzyme, ist eine Analysenmethode zur Quantifizierung der verschiedenen Reaktionsprodukte. Diese Methode muß mehrere Anforderungen erfüllen: Sie sollte eine hohe Empfindlichkeit besitzen, damit auch Spuren der Alkaloide in Zellkulturen und differenzierten Pflanzen nachgewiesen oder geringe enzymatische Umsätze erfaßt werden können. Um auch in ungereinigten Rohextrakten die Substanzen zuverlässig quantifizieren zu können, muß das Analysenverfahren sehr spezifisch sein. Schließlich sollte es einfach in der Handhabung sein, damit größere Probenmengen, die bei den Optimierungsversuchen häufig anfallen, bewältigt werden können.

Eine Nachweismethode, die alle diese Bedingungen erfüllt, ist der Radioimmuntest (radioimmunoassay = RIA). Er kombiniert die hohe Spezifität einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit der hohen Empfindlichkeit der Radioaktivitätsmessung. Er beruht auf folgendem Prinzip: Eine definierte Menge an radioaktiv markiertem Antigen und eine variable Menge des zu messenden Antigens konkurrieren um eine begrenzte, konstante Zahl von Antikörper-Bindungsstellen. Vom Antikörper werden umso weniger radioaktiv markierte Antigenmoleküle gebunden, je mehr unmar-

kiertes Antigen vorhanden ist. Damit ist der Anteil der radioaktiven Antigen-Antikörper-Komplexe ein Maß für die Konzentration der zu bestimmenden Substanz. Um die Menge an gebundenem markiertem Antigen ermitteln zu können, werden alle Komplexe von freiem, nicht gebundenen Antigen abgetrennt. Nach dieser Trennung und der Messung der Radioaktivität der gebundenen oder freien Phase kann aus einer Eichkurve, die mit bekannten Mengen des Antigens erstellt wird, der Gehalt der Probe direkt abgelesen werden (vgl. ECKERT, 1976).

Auf dem gleichen Prinzip wie der Radioimmunoassay beruhen andere immunologische Tests, bei denen das Antigen statt mit radioaktiven Isotopen mit Enzymen, mit spin-markierten, fluoreszierenden oder metallorganischen Verbindungen markiert ist (LÜBKE und NIEUWEBOER, 1978). Sie stellen unter den modernen Analysemethoden die einzige Alternative zum Radioimmuntest dar.

Der erste RIA wurde 1959 von BERSON und YALOW zur Quantifizierung von Insulin entwickelt. Die erste niedermolekulare Substanz, die radioimmunologisch bestimmt werden konnte, war Digoxin (OLIVER et al., 1968). Zur Erzeugung der Antikörper wurde sie an ein Trägerprotein gekoppelt, da sie aufgrund ihres geringen Molekulargewichts selbst nicht immunogen war. Obwohl im Laufe der sechziger und siebziger Jahre bereits für einige hundert Substanzen Radioimmuntests entwickelt worden waren, beschränkte sich ihre Anwendung zunächst auf das Gebiet der klinischen Chemie. Erst seit 1976 wird der RIA auch für phytochemische und pflanzenphysiologische Fragestellungen eingesetzt (WEILER und ZENK, 1976).

Für die Alkaloide Codein und Morphin sind bereits eine Anzahl immunologischer Tests beschrieben. Sie wurden ebenfalls in erster Linie im medizinischen Bereich, zur Bestimmung der Substanzen in Blut-, Harn- oder Gewebeproben benutzt. Die Tests unterscheiden sich in den radioaktiven Antigenen

oder in den Konjugaten - d. h. den Kopplungsprodukten zwischen der niedermolekularen Substanz und dem Trägerprotein -, die zur Stimulierung der Immunantwort eingesetzt wurden. Erfolgte bei der Konjugatsynthese die Derivatisierung über eine der beiden freien Hydroxylgruppen des Morphins oder über die freie Hydroxylgruppe des Codeins, so führten die Immunogene zu Antiseren, die zwischen Morphin und Codein nicht differenzieren konnten (SPECTOR und PARKER, 1970; SPECTOR et al., 1973; WAINER et al., 1973; SPECTOR, 1974; WAINER et al., 1974). Ausgehend von N-Norverbindungen wurden über den zyklischen Stickstoff Derivate des Morphins (GINTZLER et al., 1976; FINDLAY et al., 1977; SUND, 1978) und Codeins (FINDLAY et al., 1976, 1977; SUND, 1978) dargestellt. Mit Hilfe dieser Immunogene konnten Antiseren produziert werden, die eine selektive Bestimmung von Morphin und Codein gestatteten.

Für eine radioimmunologische Bestimmung von Opium-Alkaloiden im Rahmen phytochemischer Untersuchungen gibt es bislang erst wenig Beispiele. 1978 entwickelte in unserer Arbeitsgruppe SUND Radioimmuntests für Codein und Morphin und setzte sie zur Selektion von Papaver-Pflanzen ein. Ein ursprünglich für klinische Analysen entwickeltes, kommerziell verfügbares Testsystem benutzten HODGES und RAPOPORT (1982b) zum Nachweis von Morphinan-Alkaloiden in Kalluskulturen von Papaver somniferum. Schließlich wendeten HSU et al. (1983) die Technik des RIA's zur Quantifizierung von Morphin in Kapseln des Schlafmohns an. Beide Arbeitsgruppen benutzten Testsysteme, die nur eine geringe Spezifität besaßen - sowohl Codein und Morphin als auch Thebain wurden erfaßt -, so daß für zuverlässige Meßergebnisse eine Reinigung oder chromatographische Auftrennung der zu analysierenden Proben unerlässlich war.

Außer für Codein und Morphin wurden bislang für keine weiteren Metaboliten der Morphin-Biosynthese immunologische Tests beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, für die wichtigsten Zwischenstufen der Biosynthesesequenz, nämlich (S)- und (R)-Retikulin, Salutaridin sowie Thebain Radioimmuntests aufzubauen. Darüber hinaus sollten die von SUND (1978) für Codein und Morphin entwickelten Testsysteme optimiert und hinsichtlich ihrer Spezifität genau charakterisiert werden.

Die Radioimmuntests sollten angewendet werden für Untersuchungen zum Vorkommen der Opium-Alkaloide in differenzierten Pflanzen; insbesondere sollten sie die Charakterisierung des Alkaloid-Spektrums von Papaver-Arten und die Selektion von Papaver somniferum-Pflanzen ermöglichen. Weiterhin konnte im Verlauf der Arbeit ihre Einsatzmöglichkeit bei der Optimierung von pflanzlichen Gewebekulturen demonstriert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

1.1. Herkunft und Anzucht der Pflanzen

Pflanzen verschiedener Papaver-Arten wurden aus Samenmaterial angezogen, das von Botanischen Gärten aus aller Welt zur Verfügung gestellt worden war. Die Samen wurden Mitte März in Plastiktöpfen ($\emptyset = 9$ cm) ausgesät, die eine Mischung aus Torf, Sand und Humuserde (1:1:1) enthielten. Die Keimung erfolgte im Gewächshaus bei einer konstanten Temperatur von 20°C, 60 - 70 % Luftfeuchtigkeit und 12-stündiger künstlicher Belichtung mit 2000 Lux (Leuchtstoffröhren Osram L 65W/77R).

Die für die Selektionsuntersuchungen vorgesehenen Papaver somniferum-Pflanzen wurden nach etwa drei Wochen zunächst in Kunststofftöpfen pikiert und unter den genannten Bedingungen weiter angezogen. Anfang Mai wurden sie auf einem Versuchsfeld in Reihen mit einem Abstand von ca. 70 cm ausgepflanzt.

Von den anderen Papaver-Arten wurden je fünf Keimlinge der gleichen Art und Herkunft in Plastikkübeln pikiert, die einen Durchmesser von 16,5 cm besaßen und mit der zuvor beschriebenen Erdmischung gefüllt waren. Die weitere Anzucht dieser Pflanzen erfolgte auf dem Dachgarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie.

Herrn Nagy und Herrn Meier sei an dieser Stelle herzlich für die Anzucht der Papaver-Pflanzen gedankt.

1.2. Herkunft des Herbarmaterials

Die Untersuchung von Herbarmaterial wurde ermöglicht, weil folgende Institute dankenswerterweise die Entnahme von etwa 5 x 5 mm großen Proben aus Herbarbögen gestatteten: Staatsherbar München, Herbar der Universität Göttingen, Kew Garden London, Senckenbergisches Museum Frankfurt, Herbar des Botanischen Gartens Genf, Herbar der Universität Istanbul und Herbar der Universität Leningrad.

Weitere Herbarpflanzen konnten aus den selbst angezogenen Papaver-Arten angelegt werden. Ihre richtige taxonomische Bezeichnung wurde vor der Alkaloid-Bestimmung überprüft (FEDDE, 1909; VENT et al., 1968; GOLDBLATT, 1974; HAMMER und FRITSCH, 1977).

1.3. Aufarbeitung von Pflanzenmaterial

Herbarmaterial (3-10 mg) wurde in 1,5 ml-Eppendorfgeläßen mit 1,5 ml 80 % Methanol extrahiert.

Für die Selektionsuntersuchungen von Papaver somniferum wurden den Pflanzen fünf Tage nach ihrem Aufblühen Latex-, Blatt- und Stengelproben entnommen. Die Entnahme von 1 µl Latex erfolgte, nach Anritzen der Kapsel, mit einer 1 µl-Micropipette der Firma Drummond Scientific Co., USA (bezogen von Bachofer, Reutlingen). Aus dem Mittelteil des jüngsten voll entfalteten Blattes wurde mit einer Lochzange (Fa. Gering und Co., Gelnhausen) ein kreisrundes Stück von 5 mm Durchmesser ausgestanzt. Mit einem Skalpell wurde aus der Sproßachse unterhalb des ältesten Blattes ein Gewebestück von 1 cm Länge, 0,5 cm Breite und 2 mm Dicke herausgeschnitten. Zur vereinfachten Berechnung der Alkaloidgehalte wurde für alle Blattkreise ein Trockengewicht von 0,64 mg und für sämtliche Stengelstücke ein Trockengewicht von 2,6 mg zu-

grundegelegt, nachdem in Vorversuchen nur Gewichtsschwankungen von maximal 10 % ermittelt worden waren. Alle Proben wurden in 1,5 ml-Eppendorfgläsern mit 1 ml 80 % Methanol extrahiert.

Der Bestimmung der Opiumalkaloide in verschiedenen Papaver-Arten dienten Extrakte von Blattgewebe. Proben des jüngsten Blattes (0,15 - 0,3 g FG) wurden den Pflanzen am Tage ihres Aufblühens morgens entnommen und mit 5 ml 80 % Methanol extrahiert.

Bei den übrigen Untersuchungen wurde das Pflanzenmaterial, falls erforderlich, zerkleinert und mit 5 ml 80 % Methanol pro 0,5 g frischem Gewebe versetzt.

Die Extraktion erfolgte grundsätzlich 12 Stunden bei 60°C. Danach wurden die Proben mit Lösungsmittel auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und vor der radioimmunologischen Bestimmung der Alkaloide mit H₂O auf eine geeignete Konzentration verdünnt.

2. Zellkulturtechniken

2.1. Herkunft der Zellkulturen

Die Kalluskultur Papaver somniferum / Stamm P049 ist 1977 aus Samenmaterial angelegt worden, das aus dem Botanischen Garten Dublin stammte. Sofern die weiteren Kulturen nicht im Rahmen dieser Arbeit neu etabliert wurden (vgl. III.8.2.1.) stammten sie aus der Zellkultursammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

2.2. Medien

Für die Anzucht der untersuchten Kalluskulturen wurden, wie im einzelnen angegeben, folgende Medien verwendet:

LS nach LINSMAIER und SKOOG (1965) mit 10^{-6} M 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 10^{-6} M 1-Naphtylessigsäure

4x nach GAMBORG et al. (1968) mit 0,2 % NZ-Aminen, 10^{-5} M 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 3×10^{-6} M 1-Naphtylessigsäure, 3×10^{-6} M 3-Indoleessigsäure und 10^{-6} M Kinetin.

Die Erhaltung von Papaver-Kallus- und -Suspensionskulturen erfolgte in LS-Medium.

Für die Versuche zur Steigerung der Thebain-Produktion einer Papaver somniferum-Suspensionskultur wurden Medien nach WHITE (1939), KNUDSON (1946), HELLER (1953), MURASHIGE und SKOOG (1962), LINSMAIER und SKOOG (1965), BLAYDES (1966), GAMBORG et al. (1968), NITSCH und NITSCH (1969), VELICKY und MARTIN, (1969), GRESSHOFF und DOY (1972) und RINGE (1972) eingesetzt. Wie im einzelnen angegeben, wurden sie hinsichtlich der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie der Hormonzusammensetzung variiert.

Alle verwendeten Medien enthielten, wenn sie für Kalluskulturen benötigt wurden, 0,8 % Difco-Bacto-Agar.

2.3. Sterilisationsverfahren

Medien, Büchnertrichter mit eingelegten Netzen, Glasgeräte und die für Sterilfiltrationen benötigten Filter wurden bei 121°C und einem Druck von 1,25 atü 25 Minuten autoklaviert. Hierzu wurde ein Autoklav der Firma Fedegari (Zürich, Schweiz) oder ein Tischaufautoklav Typ 23 der Firma Melag (Berlin) benutzt. Spatel, Pinzetten und graduierte Löffel zum Übertragen von Gewebe wurden vor ihrer Benutzung in einer Gasflamme ausgeglüht.

Alkaloide, die in Biotransformationsexperimenten zum Kulturmedium gegeben werden sollten, waren nicht hitzestabil;

sie wurden deshalb als wässrige Lösung (2 mg/ml) durch Filtration sterilisiert (Filtrationsgerät Nr. SM 16517E und Membranfilter Nr. 11307 der Fa. Sartorius, Göttingen) und dem erkalteten autoklavierten Medium zugefügt.

Sterile Arbeitsvorgänge wurden an Laminar-Air-Flow-Kabinen (Fa. Flow, Meckenheim und Fa. Babcock, Bad Hersfeld) durchgeführt.

2.4. Anlage und Kultivierung von Kalluskulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellkulturen aus Samenmaterial angelegt. Hierzu wurden die Samen 10 Minuten in einer 5 %-igen Natriumhypochloritlösung (Fa. Merck, Darmstadt) oberflächensterilisiert, gründlich mit sterilem Wasser gespült und auf Festmedium nach NITSCH und NITSCH (1969) aufgelegt. Nach etwa einer Woche wurden die 2-3 cm großen Keimlinge mit einem Skalpelli leicht eingeritzt und zur Kallusbildung auf Agar-Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) übertragen.

Alle Festkulturen wurden in Petrischalen ($\varnothing = 5$ cm; Fa. Urbanti) bei 23°C und 70 % Luftfeuchtigkeit im Dunkeln aufbewahrt und in vierwöchigen Abständen auf frisches Medium übertragen.

2.5. Anlage, Kultivierung und Plattierung von Suspensionskulturen

Die Etablierung einer Suspensionskultur erfolgte, indem ca. 3 cm³ Kallus in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium gegeben wurden. Nach etwa einwöchiger Kultivierung wurde die entstandene Suspension in einen 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 70 ml Medium übertragen.

Zur Erhaltung von Flüssigkulturen wurden 300 ml-Erlenmeyerkolben, die 70 ml Medium enthielten, mit 30 ml Zell-

suspension angeimpft. Zur Produktion größerer Gewebemengen übertrug man 50 ml Suspension in einen 1000 ml-Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium.

Für Versuchskulturen wurden 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium verwendet. Gewebe aus Suspensionskulturen in stationärer Wachstumsphase wurde mit einem Büchnertrichter, dem ein Polyamidnetz (Monodur 100, Polyamid normal, Maschenweite 100 μm ; Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld) eingelegt worden war, vom Medium getrennt. Jeweils 1,5 g dieses Gewebes wurden als Inoculum für die Versuche eingesetzt. In Experimenten, bei denen der Einfluß verschiedener Hormone studiert werden sollte, diente Gewebe, das in Hormon-freiem Medium angezogen worden war, als Ausgangsmaterial. Die Versuchskulturen sind grundsätzlich über zwei Zyklen in den zu prüfenden Medien kultiviert worden, bevor sie geerntet und analysiert wurden.

Alle Suspensionskulturen wurden bei 23°C und 65 % Luftfeuchtigkeit im Dauerlicht (ca. 900 Lux) auf Rotations-schüttlern mit 100 Upm angezogen. Die Kultivierungsdauer betrug, falls nicht anders angegeben, 9 Tage.

Für Selektionsuntersuchungen sollten durch Plattierung von Suspensionskulturen kleinere Zellaggregate gleichmäßig in Festmedium verteilt werden. Um die plattierten Zellen auch bei geringer Zelldichte zur Teilung zu bringen, wurde konditioniertes Medium verwendet. Die Konditionierung eines Mediums wird erreicht, indem es 5 - 10 Tage mit Gewebe kultiviert wird; anschließend werden unter sterilen Bedingungen die Zellen vom Medium getrennt. 250 ml konditioniertes Medium wurden mit 2 cm^3 Gewebe und 250 ml Agar-Medium (mit doppelter Agar-Konzentration; auf 40°C abgekühlt) zusammengegeben. Diese Mischung wurde sofort als etwa 2 mm dicke Schicht in Petrischalen ausgegossen ($\varnothing$ = 9 cm, Fa. Bachofer). Die plattierten Zellen wurden bei 23°C, 70 % Luftfeuchtigkeit und im Dunkeln aufbewahrt.

2.6. Immobilisierung von Zellsuspensionskulturen

Zur Immobilisierung wurden Pflanzenzellen nach der Methode von BRODELIUS et al. (1979) in Calcium-Alginat eingeschlossen. Alginat ist ein aus Algen gewonnenes Polyuronat, das aus β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure zusammengesetzt ist (HIRST et al., 1939). Mit mehrwertigen Kationen, z. B. Calcium, bildet dieser Polyelektrolyt ein unlösliches Salz von gelartiger Konsistenz, das zum Einschluß von Zellen benutzt werden kann (CHEETHAM et al., 1979).

Eine 3 %-ige Alginatlösung wurde hergestellt, indem Alginat (Natriumsalz Typ IV; Sigma, München) mit der entsprechenden Menge H_2O versetzt und in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben 25 Minuten autoklaviert wurde. Hierdurch entstand eine zähflüssige homogene Lösung des Alginats, die für Immobilisierungen unter sterilen Bedingungen eingesetzt werden konnte.

15 g vom Medium getrennte Zellen einer Suspensionskultur wurden mit 25 ml Alginatlösung und 5 ml Medium vorsichtig vermischt und in eine 2 ml-Plastik-Einwegspritze (Henke-Sass Wolf, Typ A) ohne Nadel gegeben. Das Alginat-Zellen-Gemisch wurde unter leichtem Druck aus ca. 20 cm Höhe in ein Becherglas mit 60 ml einer 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung getropft, die auf dem Magnetrührer leicht gerührt wurde. Hierdurch kam es zur Ausbildung von Alginat-Kugeln mit einem Durchmesser von ca. 3 mm. Zur Erhöhung ihrer Stabilität wurden die Kugeln für etwa vier Stunden bei Raumtemperatur in der $CaCl_2$ -Lösung belassen. Anschließend wurden sie gründlich mit Medium gewaschen. Alle Arbeitsschritte der Immobilisierungsprozedur erfolgten unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten Geräten und Lösungen.

Durch Zugabe von Phosphatpuffer löst sich das Calcium-Alginat-Salz aufgrund der Bildung von Calcium-Phosphaten auf. Eingeschlossene Zellen können auf diese Weise wieder freigesetzt werden.

Für die Biotransformations-Experimente wurden jeweils

60 Kugeln in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium gegeben und auf einem Rotationsschüttler (100 Upm) bei 23°C, 70 % Luftfeuchtigkeit und unter Dauerlicht kultiviert.

2.7. . Aufarbeitung von Zellkultur-Material

Jeweils 0,3 - 0,5 g Kallusgewebe wurden mit 2 ml 80 % Methanol 12 Stunden bei 60°C extrahiert.

Suspensionskulturen wurden durch Vakuum-Filtration in Gewebe und Medium getrennt. Nachdem das Frischgewicht des gesamten Gewebes bestimmt worden war, wurde ein Teil zur Trockengewichts-Bestimmung 48 Stunden bei 50°C im Trockenschrank aufbewahrt. Ein weiteres Aliquot des Gewebes (0,3 g FG) wurde mit 1,5 ml 80 % Methanol 12 Stunden bei 60°C extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte von den Zellen durch Filtration getrennt und mit 80 % Methanol auf exakt 1,5 ml aufgefüllt. Für radioimmunologische Bestimmungen mußten sie mindestens 1:3 mit H₂O verdünnt werden. Das Medium von Suspensionskulturen konnte zur Bestimmung seiner Alkaloidgehalte ohne weitere Aufarbeitung und Verdünnung in die Radioimmuntests eingesetzt werden. Die Restsaccharose-Konzentration des Mediums wurde refraktometrisch (Abbé Refraktometer; Fa. Zeiss, Oberkochen) gemessen.

Für Selektionsuntersuchungen war es notwendig, Alkaloidgehalte von kleinen Zellkolonien zu bestimmen, die aus plattierten Suspensionskulturen herangewachsen waren. Mit Hilfe eines von KOLOSSA (1983) entwickelten Instruments konnten unter sterilen Bedingungen definierte Probenmengen von 3,5 mg Frischgewicht aus den Kolonien entnommen werden. Die Proben wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit 50 µl 80 % Methanol überführt, zwei Stunden bei 60°C extrahiert und mit 200 µl H₂O versetzt. Aliquots dieser Lösungen wurden unverdünnt in die Radioimmuntests eingesetzt.

3. Reagenzien

3.1. Chemikalien

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 1-Naphtylessigsäure, 3-Indolessigsäure, Saccharose, Acrylsäure, Essigsäureanhydrid, Calciumchlorid, Natriumborhydrid, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und Glycin stammten von der Firma Merck (Darmstadt). Ammoniumsulfat, Rinderserumalbumin (>99 % rein) und XAD-Adsorberharz (Typ 2, Korngröße 0,31 - 1 mm) lieferte Serva (Heidelberg). Azodicarbonsäurediäthylester und Chlorameisensäurephenylester wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen; Kinetin, Aminoxyessigsäure und 1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) von Sigma (München). 6-Benzylaminopurin wurde von Roth (Karlsruhe) geliefert, NZ-Amine von der Firma Aldag (Hamburg). Die synthetischen Wuchsstoffe stellte freundlicherweise die Firma Ciba-Geigy (Basel, Schweiz) zur Verfügung. Das für die RIA-Ansätze verwendete Rinderserum stammte von Mediapharm (Aschaffenburg).

Die verwendeten Radiochemikalien L-(C³H₃)-Methionin, NaB³H₄ und (1-³H)-Morphin (spezifische Aktivitäten wie im einzelnen angegeben) wurden von Amersham (Braunschweig) bezogen.

Von den Alkaloiden, die als Standardsubstanzen oder zur Bestimmung von Kreuzreaktionen verwendet wurden, stammten Codein, Morphin, (R,S)-Laudanidin, Glaucin, Narkotin und Narcein von der Firma Merck, Thebain sowie Papaverin von Boehringer (Ingelheim), (R,S)-Laudanosin und (R,S)-Laudanosolin von Aldrich Chemie (Milwaukee, USA). Dopamin, 3-O-Methyldopamin und 4-O-Methyldopamin lieferte Sigma, Berberin die Firma Roth. Die Substanzen 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, (S)- und (R)-Norlaudanosolin, (R,S)-Tetrahydropapaverin und Jatrorrhizin wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. Rüffer (München) überlassen, (S)-Scoulerin von Herrn Dr. Steffens

(München) und (R,S)-Tetrahydrocolumbamin sowie (R,S)-Tetrahydropalmin von Herrn Dr. Tanahashi (Kobe, Japan). Für die Bereitstellung von Oripavin danke ich Herrn Prof. Brochmann-Hanssen (Kalifornien, USA). Alle übrigen Alkaloide wurden von Herrn Prof. Nagakura (Kobe, Japan) synthetisiert, dem ich an dieser Stelle für die Überlassung der Substanzen herzlich danken möchte.

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel stammten von den üblichen Quellen und waren von größtmöglicher Reinheit.

3.2. Lösungen

Die für den Radioimmuntest verwendete physiologische Kochsalzlösung (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) hatte folgende Zusammensetzung: 1,392 g K_2HPO_4 , 0,276 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$ und 8,77 g NaCl ad 1000 ml H_2O .

Zur Herstellung von 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, pH 9, wurden 7,51 g Glycin in 1000 ml H_2O gelöst und die Lösung mit NaOH auf pH 9,0 eingestellt.

0,07 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 -Puffer, pH 5,7, wurde mit 62 ml 0,07 M KH_2PO_4 -Lösung und 938 ml 0,07 M Na_2HPO_4 -Lösung ange-setzt.

Eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung erhielt man, indem man 800 g $(NH_4)_2SO_4$ und 1000 ml H_2O 24 Stunden bei Raumtemperatur rührte und den ungelösten Rückstand abfiltrierte. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Fällungen wurden, wie im einzelnen angegeben, mit verschiedenen Verdünnungen der gesättigten Ammoniumsulfatlösung durchgeführt.

Rinderserum wurde 1:6 mit H_2O verdünnt und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Für die Tests wurden jeweils Aliquots dieser verdünnten Lösung aufgetaut.

Als Standard-Stocklösungen der Alkaloide wurden methanolische Lösungen mit einer Konzentration von 2 mg/ml benutzt, die bei -20°C aufbewahrt und alle 3 Wochen frisch angesetzt wurden. Die für die Tests erforderlichen Verdünnungsschritte erfolgten in H₂O.

4. Geräte

Massenspektren wurden mit einem Varian MAT 111 oder Finnigan MAT 44S (mit Elektronenionisation, wenn nicht anders angegeben) aufgenommen. Für UV-Spektren wurde ein DMR 11-Spektrophotometer der Firma Zeiss benutzt. Optische Drehwerte wurden mit einem Polarimeter Typ 241 (Perkin-Elmer, Überlingen) in einer 1 ml-Küvette bestimmt. Für Lyophilisierungen stand ein Gefriertrocknungsgerät der Firma Edwards, Kniese & Co. (Marburg) zur Verfügung. Der pH-Wert von Lösungen wurde mit einem Digitalmeter Digi 610 (WTW, Weilheim) bestimmt.

Für Verdünnungen großer Probenmengen wurden Pipettierautomaten des Typs Analmatic (Fa. Zinsser, Frankfurt) benutzt. Für Pipettierschritte, die bei den Radioimmuntests durchgeführt werden mußten, wurde eine Varipette oder Multipette (Eppendorf, Hamburg) eingesetzt. Die Mischung der RIA-Ansätze erfolgte an einem Multivortex-Mixer (Fa. Zinsser), die Zentrifugation an einer gekühlten Cryofuge 6-6 (Heraeus, Hanau). Als Reaktionsgefäße bei den Radioimmuntests wurden Zentrifugengläser der Größe 13 x 60 mm (Fa. Bender und Hobein, München) eingesetzt. Sie wurden nach den Tests dekontaminiert, indem sie 24 Stunden in einem verdünnten Detergens (Deconex, Fa. Bochako, Hamburg) aufbewahrt und anschließend gründlich mit entionisiertem Wasser gespült wurden.

Für mikroskopische Aufnahmen stand ein Photomikroskop II (Zeiss) zur Verfügung; die Filme stammten von der Firma Kodak (Ektachrome EH, 23 DIN).

5. Synthesen

Die im folgenden unter 5.1. - 5.8. beschriebenen Synthesen sind in Zusammenarbeit mit Prof. Nagakura (Kobe, Japan) durchgeführt worden, dem ich herzlich für seine Unterstützung danken möchte.

5.1. Synthese von (S)- und (R)-Norretikulin-N- β -Propionsäure

Optisch reines (S)- und (R)-Norretikulin war nach der Methode von RICE und BROSSI (1980) von Prof. Nagakura synthetisiert worden. Die Darstellung der Propionsäure-Derivate erfolgte getrennt durch Umsetzung der beiden Enantiomeren mit Acrylsäure (vgl. III.1.1., Abb. 7). Das Prinzip dieser Reaktion, nämlich die elektrophile Addition der Acrylsäure an den Stickstoff des Alkaloids, ist bereits bei der Herstellung eines Konjugats für das Tropanalkaloid Scopolamin erfolgreich eingesetzt worden (STÖCKIGT, in WEILER et al., 1981).

Die Synthese wurde im einzelnen folgendermaßen durchgeführt: Eine Lösung von 1 g (3,2 mmol) (S)- bzw. (R)-Norretikulin und 1,4 g (19 mmol) Acrylsäure in 35 ml Äthanol wurde 16 Stunden bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz im Vakuum bis auf ein Volumen von 7 ml eingeeengt und auf sieben Dickschichtplatten chromatographiert (20 cm x 20 cm x 1 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 1). Die untere von zwei im UV-Licht sichtbaren Zonen wurde jeweils mit Methanol eluiert und das Eluat zur Trockne eingeeengt. Dreimaliges Umkristallisieren des Rückstands aus Methanol/Äther lieferte die beiden isomeren Propionsäure-Derivate:

(S)-Norretikulin-N- β -Propionsäure:

Ausbeute: 650 mg (1,8 mmol, 56 %)

$[\alpha]_D^{22} = +72,5^\circ$ (c= 1,09 in Methanol)

Schmelzpunkt: 149-151°C.

(R)-Norretikulin-N- β -Propionsäure:

Ausbeute: 617 mg (1,7 mmol, 52 %)

$\{\alpha\}_D^{22} = -72,6^\circ$ ($c = 1,06$ in Methanol)

Schmelzpunkt: 149-151°C.

Prof. Nagakura konnte die Identität der Norretikulin-N- β -Propionsäuren anhand von IR-, Massen- und NMR-Spektren der Substanzen und ihrer methylierten Derivate eindeutig feststellen.

5.2. Synthese von Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxim

Salutaridin ist nach der Methode von BARTON et al. (1965b) aus Thebain von Prof. Nagakura synthetisiert worden. Zur Darstellung des Oxims, das sich durch Kondensation von Aminoxyessigsäure mit der Ketogruppe des Salutaridins bildet (vgl. III.2.1., Abb. 13), wurden 195 mg (0,6 mmol) Salutaridin und 218 mg (2,4 mmol) Aminoxyessigsäure in 20 ml Methanol gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren eines Niederschlags wurde das Filtrat bis auf 3 ml eingeeengt und das Reaktionsprodukt durch Dickschichtchromatographie gereinigt (20 cm x 20 cm x 2 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 2; R_f (Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxim) = 0,30). Das ^1H -NMR-Spektrum des gereinigten Produktes (200 MHz, CD_3OD) ergab: $\delta = 2,83$ (3H,s, NCH_3); 3,72 (3H,s, OCH_3); 3,83 (3H,s, OCH_3); 4,56 (2H,s, OCH_2COOH); 6,65, 6,85 (2H, AB-Quartett, $J_{AB} = 8$ Hz); 7,06 (1H,s); 7,27 (1H,s). Die Identität des Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxims wurde darüber hinaus durch das Massenspektrum seines methylierten Derivates bestätigt: MS m/z (rel. Int. %): 428 (M^+ , 100), 413 (73), 355 (47). Die Ausbeute an gereinigtem Produkt betrug 170 mg (0,4 mmol; 67 %).

5.3. Darstellung von Northebain

Thebain wurde nach einer Vorschrift von ELI LILLY & CO (1966) zu N-Northebain demethyliert (Abb. 4).

Versuchsdurchführung:

6,2 g (20,1 mmol) Thebain und 4,2 g (24,4 mmol) Azodicarbonsäurediäthylester wurden in 40 ml Benzol gelöst und 5 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, der Rückstand in 30 ml Äthanol, 30 ml H₂O und 20 ml NH₄OH (25 %) aufgenommen und erneut 5 Stunden am Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurde das Reaktionsgemisch in 40 ml 10 %-iger-Na₂CO₃-Lösung aufgenommen und mit dreimal 50 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden auf 4 ml eingengt und auf eine Kieselgelsäule (2 cm ϕ x 24 cm Höhe) aufgetragen. Elution mit CHCl₃/Methanol (19/1) lieferte noch verunreinigtes Northebain. Es wurde durch Dickschichtchromatographie (20 cm x 20 cm x 0,75 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 3; R_f (Northebain)= 0,25; R_f (Thebain)= 0,38) weiter gereinigt und aus Methanol umkristallisiert. Das saubere Reaktionsprodukt hatte einen Schmelzpunkt von 158-160°C (Literatur: 152-153°C; ELI LILLY & CO, 1966) und besaß das erforderliche Molekulargewicht von 297, wie massenspektroskopisch gezeigt werden konnte. Die Ausbeute an Northebain betrug 1,5 g (5,2 mmol; 26 %).

5.4. Darstellung von Northebain-N- β -Propionsäure

588 mg (2,0 mmol) Northebain und 224 mg (3,1 mmol) Acrylsäure wurden in 20 ml Äthanol gelöst; nach 21-stündiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur wurden dem Reaktionsansatz erneut 52 mg (0,7 mmol) Acrylsäure zugefügt und das Gemisch für weitere 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in H₂O aufgenommen und die wässrige Phase mit Äther gewaschen. Das Reak-

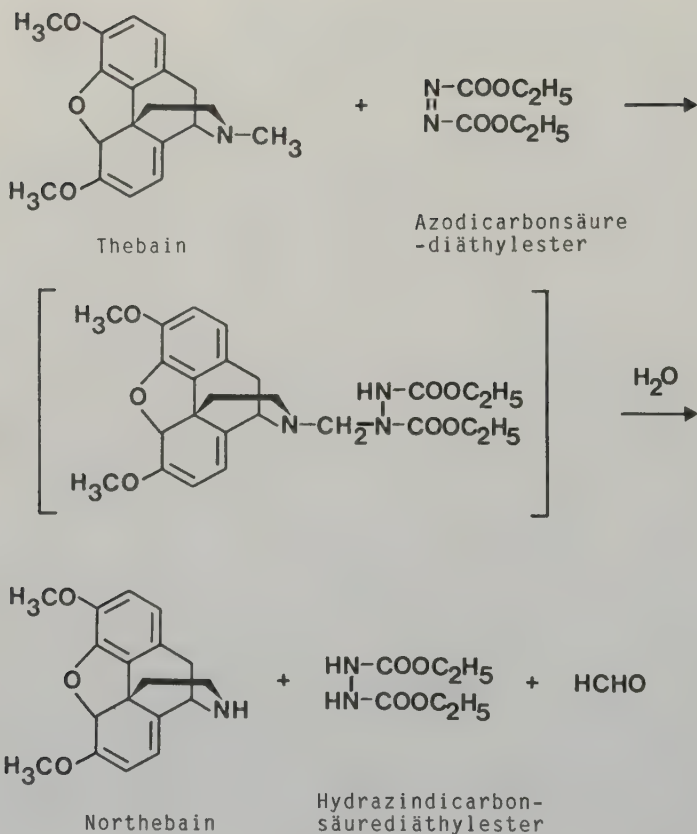


Abb. 4: Demethylierung von Thebain zu Northebain mit Azodicarbonsäurediäthylester (nach ELI LILLY & Co., 1966).

tionsprodukt erwies sich nach Reinigung durch Dickschichtchromatographie (20 cm x 20 cm x 1 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 4; R_f (Northebain-N- β -Propionsäure) = 0,18) als sauber. Es wurde identifiziert durch sein Massenspektrum ($M^+ = 369$) sowie durch das Massenspektrum seines methylierten Derivates ($M^+ = 383$). Die Ausbeute der Reaktion betrug 546 mg (1,5 mmol; 75 %).

5.5. Synthese von Norcodein

Vor dem Entfernen der N-Methylgruppe von Codein mußte die freie Hydroxylgruppe durch Acetylierung geschützt werden. Hierzu wurden 3 g (10 mmol) Codein und 5 g (50 mmol) Essigsäureanhydrid für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hydrolyse von überschüssigem Anhydrid mit Eiswasser wurde der Reaktionsansatz mit Na_2CO_3 alkalisiert, 6-Acetylcodein mit CHCl_3 extrahiert und aus Äther umkristallisiert. Die isolierten Kristalle (2,5 g; 7,3 mmol; 73 % Ausbeute) erwiesen sich dünnschichtchromatographisch als sauber (vgl. II.6., Laufmittelsystem 3; R_f (6-Acetylcodein) = 0,33).

Nach der Vorschrift von ELI LILLY & CO (1966) wurde 6-Acetylcodein mit Azodicarbonsäurediäthylester demethyliert und das acetylierte N-Norcodein durch Extraktion aus dem Reaktionsansatz isoliert. Es wurde ohne weitere Reinigung für den letzten Schritt der Norcodein-Synthese, nämlich die Hydrolyse der Acetylgruppe eingesetzt. Hierzu wurde 6-Acetylnorcodein (1 g; 3,1 mmol) in 5 ml Methanol für 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 30 ml 1 % KOH (w/v) behandelt und der Reaktionsansatz anschließend mit dreimal 50 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Das Reaktionsprodukt wurde aus dem Rückstand der organischen Phasen durch Dickschichtchromatographie gereinigt (20 cm x 20 cm x 1 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 4; R_f (Norcodein) = 0,28) und aus Aceton umkristallisiert. Es konnte aufgrund seines Massenspektrums ($M^+ = 285$) als Norcodein

identifiziert werden. Der Schmelzpunkt der Verbindung lag bei 187-189°C (Literatur: 186°C; SPEYER und WALTHER, 1930).

5.6. Synthese von Norcodein-N- β -Propionsäure

200 mg (0,7 mmol) Norcodein und 300 mg (4,2 mmol) Acrylsäure wurden in 6 ml Äthanol gelöst und zwei Stunden bei 60°C aufbewahrt. Während dieser Zeit fiel das Reaktionsprodukt im Inkubationsansatz kristallin aus. Nach erneutem Umkristallisieren aus Äthanol konnten 199 mg (0,6 mmol; 86 %) Norcodein-N- β -Propionsäure erhalten werden:

Dünnschichtchromatographie: Laufmittel 4 (vgl. II.6.):

Rf = 0,15.

Schmelzpunkt: 177-178°C.

MS m/z: 357 (M^+).

5.7. Synthese von Normorphin

Normorphin wurde nach ABDEL-MONEM und PORTOGHESE' (1972) durch Demethylierung von Morphin (1,5 g; 5,3 mmol) mit Hilfe von Chlorameisensäurephenylester dargestellt und aus dem Reaktionsgemisch durch Extraktion isoliert. Der erhaltene Extrakt wurde einer chromatographischen Reinigung unterworfen (20 cm x 20 cm x 1 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 5; Rf (Morphin) = 0,18). Die Elution einer Bande mit dem Rf-Wert 0,1 lieferte Normorphin, das aus H₂O umkristallisiert werden konnte:

Schmelzpunkt: 273-277°C (Literatur: 276-277°C; ABDEL-MONEM und PORTOGHESE, 1972).

MS m/z: 271 (M^+).

Die Ausbeute der Reaktion betrug 154 mg (0,6 mmol; 11 %).

5.8. Synthese von Normorphin-N- β -Propionsäure

150 mg (0,6 mmol) Normorphin und 300 mg (4,2 mmol) Acrylsäure wurden in 4 ml Äthanol gelöst und für 18 Stunden auf 60°C erhitzt. Das Reaktionsprodukt konnte aus dem Inkubationsansatz durch Dickschichtchromatographie gereinigt werden (20 cm x 20 cm x 1 mm; vgl. II.6., Laufmittelsystem 6; Rf (Normorphin)= 0,15; Rf (Normorphin-N- β -Propionsäure)= 0,04).

5.9. Kopplung der Propionsäure-Derivate von Northebain, Norcodein und Normorphin an Rindersealbumin

Zur Darstellung der Konjugate für Thebain, Codein und Morphin wurden die Propionsäure-Derivate der drei Verbindungen (vgl. II.5.4., II.5.6., II.5.8.) an Rindersealbumin (BSA) gekoppelt. Dies geschah, indem Amidbindungen zwischen den Carboxylgruppen der derivatisierten Alkaloide und den Aminogruppen des Proteins geknüpft wurden. Die für diese Reaktion notwendige Aktivierung der Carboxylfunktionen erfolgte mit Hilfe eines wasserlöslichen Carbodiimid-Derivates (Abb. 5). Die Kopplungen wurden im einzelnen folgendermaßen durchgeführt: Durchführung der Thebain-Konjugatsynthese:

74 mg (200 μ mol) Northebain-N- β -Propionsäure und 180 mg (3 μ mol) BSA wurden in 5 ml H₂O gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 400 mg (2000 μ mol) 1-Ethyl-3(3-Dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) wurde das Reaktionsgemisch 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend bei 4°C 4 Tage gegen entionisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Durchführung der Codein-Konjugatsynthese:

Eine Lösung von 72 mg (200 μ mol) Norcodein-N- β -Propionsäure und 180 mg (3 μ mol) BSA in 10 ml H₂O wurde mit 0,1 M NaHCO₃ auf pH 7,7 eingestellt. Insgesamt 948 mg (4800 μ mol) EDC wurden in drei Portionen hinzugefügt und der Ansatz 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend 4 Tage bei 4°C gegen entionisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

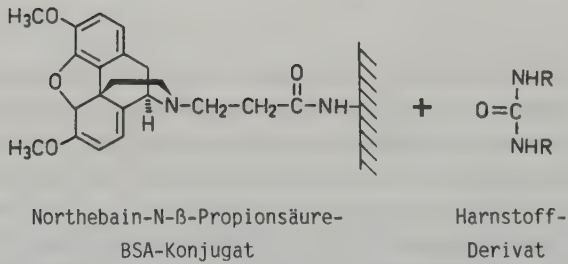
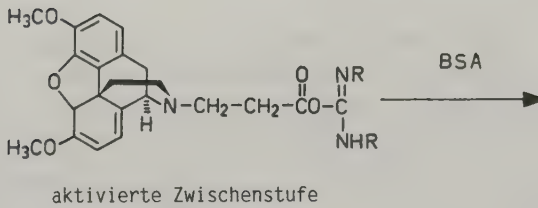
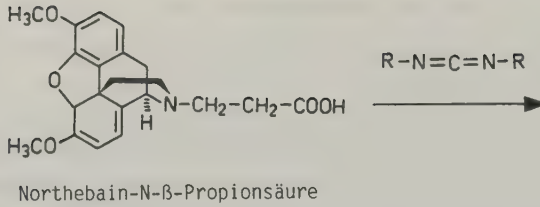


Abb. 5: Kopplung von Northebain-N- β -Propionsäure an BSA mit Hilfe eines Carbodiimid-Derivates. Die Kopplung von Norcodein- und Normorphin-N- β -Propionsäure an das Protein verläuft analog.

Durchführung der Morphin-Konjugatsynthese:

100 mg (293 μmol) Normorphin-N- β -Propionsäure und 180 mg (3 μmol) BSA wurden in 5 ml H_2O gelöst und die Lösung mit 0,1 M NaHCO_3 auf pH 7,7 eingestellt. In vier Portionen wurden 1,2 g (5800 μmol) EDC hinzugegeben und das Gemisch unter Rühren 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dialyse (4 Tage bei 4°C) gegen entionisiertes Wasser und Gefrier-trocknung konnten 182 mg des sauberen Konjugats erhalten werden.

5.10. Darstellung von (S)- und (R)-(NC^3H_3)-Retikulin

Die Darstellung der tritiummarkierten Retikulin-Enantiomeren erfolgte mit Hilfe von zwei enzymkatalysierten Reaktionen nach einer von STEFFENS (1984) entwickelten Methode: L-(C^3H_3)-Methionin wurde unter der Katalyse einer S-Adenosyl-methionin (SAM)-Synthetase zu S-Adenosyl-L-(C^3H_3)-methionin umgesetzt. Die markierte Methylgruppe des SAM's konnte anschließend mit Hilfe einer spezifischen N-Methyltransferase auf (S)- bzw. (R)-Norretikulin übertragen werden, wobei (S)- oder (R)-(NC^3H_3)-Retikulin gebildet wurde. Die SAM-Synthetase wurde aus einem Escherichia coli-Stamm gewonnen, die N-Methyl-transferase aus Zellkulturen von Berberis wilsoniae.

Die Isolierung der Enzyme, die Umsetzung von 5 mCi L-(C^3H_3)-Methionin (Spezifische Aktivität: 80 Ci/mmol) und die Aufarbeitung der markierten Reaktionsprodukte wurde wie von STEFFENS (1984) beschrieben durchgeführt. Die Ausbeuten an gereinigtem Retikulin betrugen 39 % für das (S)-Enantiomer und 23 % für das (R)-Enantiomer, jeweils bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität. Herrn Dr. Steffens danke ich für die Unterstützung bei den Synthesen. Die spezifischen Aktivitäten der markierten Substanzen wurden nach der "self-displacement"-Methode (CHERVU und MURTY, 1975) aus den Standardkurven der Radioimmuntests für die Retikulin-Isomere bestimmt (vgl. III. 1.4.). Der Wert für (S)-Retikulin betrug 7,2 Ci/mmol, der für

(R)-Retikulin 3,2 Ci/mmol.

5.11. Synthese von Salutaridinol I und II

Die Darstellung von Salutaridinol I und II erfolgte nach BARTON et al. (1965b): 8 mg (24 μmol) Salutaridin wurden in 0,4 ml Äthanol gelöst, mit 5 mg (132 μmol) NaBH_4 versetzt und das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei 0°C sowie 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1 ml H_2O aufgenommen und zweimal mit 5 ml CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingengt und die beiden Alkohole durch Dünnschichtchromatographie gereinigt (vgl. II.6.; 1. Laufmittelsystem 8; R_f (Salutaridin)= 0,61, R_f' (Salutaridinol I)= 0,08, R_f (Salutaridinol II)= 0,21; 2. Laufmittelsystem 9; R_f (Salutaridin)= 0,71, R_f (Salutaridinol I)= 0,44, R_f (Salutaridinol II)= 0,66). Die Ermittlung der Ausbeuten erfolgte photometrisch; hierbei wurde der molare Extinktionskoeffizient von Salutaridin ($\epsilon_{243}^{\text{MeOH}} = 17,44 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$) zugrunde gelegt. Die Ausbeuten betrugen 317 μg (1,0 μmol , 4,2 %) für Salutaridinol I und 247 μg (0,8 μmol , 3,3 %) für Salutaridinol II. Die beiden Verbindungen wurden anhand ihrer Massenspektren (chemische Ionisation) identifiziert: MS m/z (rel. Int. %): 330 (M^{+1} , 34), 329 (6), 328 (5), 314 (6), 313 (21), 312 (100), 311 (11), 298 (5), 255 (4). Durch einen Vergleich ihrer R_f -Werte im Laufmittelsystem 8 (vgl. II.6.) mit den in der Literatur angegebenen Daten (BARTON et al., 1965b; R_f (Salutaridinol I)= 0,25, R_f (Salutaridinol II)= 0,11) konnte die Zuordnung der zwei Produkte zu den Epimeren I und II getroffen werden.

6. Chromatographische Verfahren

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden, wie im einzelnen angegeben, Kieselgel-Dünnschichtplatten

(20 cm x 20 cm x 0,25 mm; Polygram Sil G/UV₂₅₄; Macherey und Nagel, Düren) oder Aluminiumoxid-Dünnschichtplatten (20 cm x 20 cm x 0,2 mm; AlO₂ 60F254 neutral Typ E, Merck) verwendet. Präparative Auftrennungen erfolgten auf selbstgestrichenen Dickschichtplatten oder in Säulen, unter Verwendung von Kieselgel (60 GF₂₅₄, Nr. 7730; Merck). Die in Tabelle 1 aufgelisteten Laufmittelsysteme wurden eingesetzt.

Die Verteilung radioaktiv markierter Substanzen auf Chromatogrammen konnte mit Dünnschichtscannern (LB 2722-2 und TLC Linear Analyzer, Berthold, Wildbad) ermittelt werden; nicht radioaktiv markierte Substanzen wurden anhand ihrer UV-Löschung bei 254 nm detektiert.

Zur Auftrennung von Alkaloid-Rohextrakten für radioimmunologische Analysen wurde die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) eingesetzt; hierbei fand folgendes System Verwendung:

Gerät: SP 8700 solvent delivery system, SP 4100 computing integrator, SP 8440 UV/vis detector (Spectra Physics, Santa Clara, USA)
Vorsäule: Vydac-101 SI, 4 mm ϕ x 6 cm Höhe (Macherey und Nagel)
Säule: Nucleosil 10 C18, 4 mm ϕ x 25 cm Höhe (Macherey und Nagel)
Fließmittel: linearer Gradient: 0,0085 % H₃PO₄ (0 Minuten)
- Acetonitril: 0,0085 % H₃PO₄ = 50:50 (30 Minuten)
Flußrate: 1,5 ml/min.
Detektion: Extinktion bei 284 nm

Die HPLC-Auftrennung der radioimmunologisch erfaßbaren Alkaloide (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin mit dem genannten System zeigt Abb. 6.

Nr.	Laufmittelsystem
1.	K; Chloroform : Methanol = 70 : 30
2.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 75 : 34 : 4,5
3.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 90 : 10 : 1
4.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 80 : 20 : 3
5.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 80 : 20 : 0,5
6.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 80 : 20 : 1
7.	K; Toluol : Essigsäureäthylester : Diäthylamin = 70 : 20 : 10
8.	A; Chloroform = 100
9.	K; Chloroform : Aceton : Diäthylamin = 50 : 40 : 10
10.	K; 1-Propanol : H_2O : HCOOH = 60 : 35 : 5
11.	K; Benzol : Essigsäure : H_2O = 40 : 47 : 20
12.	K; Chloroform : Methanol : NH_4OH (25 %) = 90 : 20 : 0,3
13.	K; Essigsäureäthylester : Methyläthylketon : HCOOH : H_2O = 50 : 30 : 10 : 10
14.	K; Chloroform : 2-Propanol = 40 : 10
15.	K; Chloroform : Methanol : Aceton = 80 : 10 : 10
16.	K; Toluol : Aceton : Äthanol : NH_4OH (25 %) = 45 : 45 : 7 : 3

Tab. 1: Laufmittelsysteme für dünnschichtchromatographische Trennungen (K $\hat{=}$ Kieselgel; A $\hat{=}$ Aluminiumoxid).

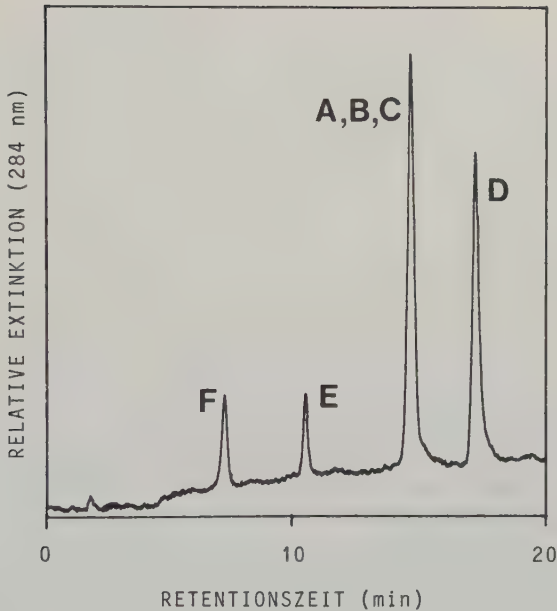


Abb. 6: Trennung von (S)-Retikulin (A), (R)-Retikulin (B), Salutaridin (C), Thebain (D), Codein (E) und Morphin (F) durch HPLC. Chromatographische Bedingungen: vgl. II.6.

7. Erzeugung von Antikörpern

Die Erzeugung von Antikörpern wurde in Kaninchen durchgeführt, die zu Beginn der Immunisierung etwa 12 - 16 Wochen alt waren. Sie waren in einem klimatisierten Raum bei 20 - 22°C untergebracht.

Die Herstellung der Konjugatlösung, mit der die Tiere

immunisiert werden sollten, erfolgte folgendermaßen: Eine Lösung des gefriergetrockneten Konjugats in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (vgl. II.3.2.) (2 mg Protein/ml) wurde im Verhältnis 1:1 mit kompletten Freund'schen Adjuvans (Difco) gemischt und durch Ultraschall (Sonifier B-12/B-15; Branson, Heusenstamm) emulgiert.

Der Immunisierungsvorgang begann mit vier Vorimmunisierungen, die im Abstand von jeweils einer Woche stattfanden. Hierzu wurde den Kaninchen 0,5 ml Konjugatlösung ($\approx$ 0,5 mg Konjugat) intradermal in die Rückenhaut injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Vorimmunisierung und im folgenden alle 4 Wochen erhielten die Tiere Boosterinjektionen; dazu wurde ihnen 1 ml Konjugatlösung ($\approx$ 1 mg Konjugat) intramuskulär in die Oberschenkel des rechten oder linken Hinterlaufs gespritzt. Für die Injektionen wurden 2 ml-Einwegspritzen (Henke-Sass Wolf, Typ A) mit aufgesetzter Kanüle (Erosa Nr. 14, 0,65 x 30 mm) verwendet.

7-14 Tage nach jeder Boosterinjektion erfolgte eine Blutentnahme: 20 - 40 ml Blut konnten durch leichtes Anritzen eines Ohres aus der Ohrvene gewonnen werden. Das in Plastikzentrifugenbechern aufgefangene Blut wurde zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt; dann wurde es mit Hilfe einer Pasteurpipette von der Gefäßwand gelöst und über Nacht bei 4°C stehengelassen, wobei sich das Blutserum vom Blutkuchen absonderte. Das Serum wurde dann in einer Kühlzentrifuge (Sorvall Superspeed RC 58 mit dem Rotor SS 34; Dupont Instruments, USA) 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert; der Überstand bildete das Antiserum, das ohne weitere Reinigung in die Radioimmuntests eingesetzt werden konnte. Es wurde bis zu seiner Verwendung bei -20°C aufbewahrt; bei dieser Lagerung war über mehrere Jahre keine Verschlechterung der immunologischen Eigenschaften erkennbar.

8. Durchführung der Radioimmuntests

Die Zusammensetzung der verschiedenen Inkubationsansätze für die Radioimmuntests ist in Tabelle 2 aufgeführt. Es treten jeweils vier verschiedene Ansatztypen auf: Die T-Proben liefern die eingesetzte Totalradioaktivität. Mit den UB-Proben, die weder Antiserum noch unmarkiertes Antigen enthalten, lassen sich unspezifische Faktoren erfassen, wie z. B. die Blindzählrate des Zählers oder die unspezifische Bildung unlöslicher Komplexe zwischen dem markierten Antigen und anderen Strukturen. Die B_0 -Ansätze zeigen die Bindung des markierten Antigens an den Antikörper bei Abwesenheit von unmarkiertem Antigen, mit den B-Proben kann diese Bindung bei Anwesenheit von unmarkiertem Antigen bestimmt werden. Die UB-, B_0 - und B-Ansätze wurden jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von Ammoniumsulfatlösung und erneute Inkubation (60 min., 4°C) konnten die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe ausgefällt werden. Sie wurden von freiem Antigen durch 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm getrennt. Die Überstände wurden verworfen, die Sedimente in einer zu 49 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die dabei entstehenden Pellets wurden in 0,25 ml Wasser gelöst und mit 1 ml Szintillator (Minisolve 1; Fa. Zinsser) versetzt. Die T-Proben wurden direkt mit 1 ml Szintillator gemischt. Die Radioaktivität aller Proben wurde im Szintillationszähler (Betaszint BF 5004; Berthold, Wildbad) gemessen (Zählzeit: 2 min.).

Der optimale Puffer und die für die Fällung günstigste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wurden für jeden Test individuell bestimmt (vgl. III.1.2., III.2.3., III.3.2.). Lediglich für die Codein- und Morphin-Radioimmuntests wurden die von SUND (1978) ermittelten optimalen Bedingungen übernommen. Es wurde für beide Tests 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer, pH 9,0, benutzt; die Fällung der Proben erfolgte durch Zugabe von 1,2 ml einer zu 91 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (vgl. II.3.2.).

Ansatztyp	T	UB	B ₀	B
H ₂ O (ml)	--	0,15	0,05	--
Standard oder Probe (ml)	--	--	--	0,05
Inkubationslösung (ml)	0,25	0,75	0,75	0,75
Antiserumverdünnung (ml)	--	--	0,10	0,10

Tabelle 2: Zusammensetzung der verschiedenen Ansatztypen eines Radioimmuntests. Die Inkubationslösung besteht jeweils aus 0,05 ml H₂O, 0,5 ml Puffer, 0,1 ml Rinder Serumverdünnung und 0,1 ml einer verdünnten Lösung des markierten Antigens ($\approx$ 5000-10000 cpm).

9. Berechnung radioimmunologischer Ergebnisse

Die Radioaktivitätsmessungen der einzelnen Proben liefern cpm-Werte, mit denen folgende Berechnungen durchgeführt werden können:

1. Berechnung der prozentualen unspezifischen Bindung (UB):

$$UB(\%) = \frac{cpm_{UB} \cdot 100}{cpm_T \cdot 3}$$

2. Berechnung der prozentualen Bindung, bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität, in Ansätzen mit und ohne unmarkiertem Antigen (B₀, B):

$$B_0, B(\%) = \frac{(cpm_B - cpm_{UB}) \cdot 100}{cpm_T \cdot 3}$$

3. Berechnung der relativen prozentualen Bindung, bezogen auf die Bindung des markierten Antigens bei Abwesenheit von unmarkiertem Antigen (B/B₀):

$$B/B_0(\%) = \frac{(cpm_B - cpm_{UB}) \cdot 100}{(cpm_{B_0} - cpm_{UB})}$$

Für die Ermittlung der Standardkurve wurden stets die B/B_0 -Werte herangezogen.

4. Berechnung der logit-Transformation der B/B_0 -Werte (FELDMANN und RODBARD, 1971), die der Linearisierung der Standardkurve dient:

$$\text{logit} \{B/B_0(\%)\} = \ln \frac{B/B_0 (\%)}{100 - B/B_0 (\%)}$$

Die bei den Radioaktivitätsbestimmungen anfallenden Daten wurden mit Hilfe einer Teletype (Modell 43, Fa. Soeder, Langen) auf einem Lochstreifen gespeichert und mit Hilfe eines Kleincomputers (Rechner 9825A, Lochstreifenleser 9863A und Drucker 9871A; Hewlett-Packard, Loveland, USA) ausgewertet (WEILER, 1977).

III. E R G E B N I S S E

1. Aufbau eines Radioimmuntests für (S)- und (R)-Retikulin

1.1. Darstellung von (S)- und (R)-Retikulin-Konjugaten zur Erzeugung spezifischer Antikörper

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines Radioimmuntests ist die Erzeugung von Antikörpern gegen die zu messende Substanz. Von den Eigenschaften des Antiserums sind wichtige Charakteristika des Testsystems, wie seine Spezifität und Empfindlichkeit, abhängig. Während andere Parameter des Tests, z. B. die radioaktive Markierung des Antigens oder die Methode zur Trennung der gebundenen und ungebundenen Antigenmoleküle, variiert und optimiert werden können, kann auf die Eigenschaften der Antikörper kein Einfluß genommen werden. Dies gilt jedoch nicht einschränkungslos. Substanzen, deren Molekulargewicht geringer als 1000 ist, müssen zur Erzeugung von Antikörpern kovalent an größere Proteine gebunden werden, da sie selbst nicht immunogen sind. Die Art dieser Kopplung beeinflusst wesentlich die Spezifität der Antikörper gegenüber den verschiedenen Strukturmerkmalen der niedermolekularen Substanz, die auch als Hapten bezeichnet wird. Der Teil der Verbindung, der zur Verknüpfung mit dem Protein benutzt wird, ist gegenüber dem ursprünglichen Molekül verändert, so daß die Antikörper diesen Teil der Ausgangsverbindung nicht erkennen können. Dagegen werden die funktionellen Gruppen, die von der Kopplungsstelle entfernt liegen, meist sehr spezifisch erfaßt (CHARD, 1978). Demnach hat die Entscheidung, wie die Bindung des Haptens an das Protein erfolgt, wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaften des Antiserums und damit auf die Qualität des Radioimmuntests.

Die gegen (S)- bzw. (R)-Retikulin gerichteten Antikörper

mußten zwei Anforderungen genügen:

1. Sie sollten die Stereochemie des Retikulins am C-Atom 1 (vgl. Abb. 2) erkennen und damit ermöglichen, spezifische Tests für jedes der beiden Enantiomeren zu entwickeln.
2. Substanzen, die sich im Methylierungsmuster der beiden aromatischen Ringe vom Retikulin unterscheiden (vgl. Abb. 2), durften von den Antikörpern nicht gebunden werden. Für zahlreiche Biosynthese-Untersuchungen war es erforderlich, in Anwesenheit anderer Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloide Retikulin selektiv nachzuweisen und zu quantifizieren, da es eine zentrale Rolle im Stoffwechsel des Morphins, aber auch anderer Benzylisochinoline spielt (vgl. CORDELL, 1981). Diese zweite Bedingung schloß eine Kopplung der Retikulin-Isomere über eine der beiden freien Hydroxylgruppen der aromatischen Ringe aus. Es bot sich daher an, eine Derivatisierung über den Stickstoff des Heterozyklus durchzuführen und hiermit eine funktionelle Gruppe für eine Verknüpfung mit dem Protein in das Molekül einzubauen.

Ausgehend von optisch reinem (S)- bzw. (R)-Norretikulin wurden durch Addition von Acrylsäure die beiden enantiomeren Norretikulin-N- β -Propionsäuren dargestellt (vgl. II.5.1.). Hierdurch war eine Carboxylgruppe in das Molekül eingeführt worden, über die unter Entstehung einer Amidbindung das Derivat an Rinderserumalbumin gekoppelt werden konnte. Dies geschah mit Hilfe der Carbodiimid-Methode (vgl. II.5.9.). Die Synthese der Retikulin-Konjugate ist in Abbildung 7 zusammenfassend dargestellt.

Die Kopplung an das Protein wurde im einzelnen folgendermaßen durchgeführt (nach ARENS, 1979):

Lösung A: 181 mg (466 μ mol) (S)- oder (R)-Norretikulin-N- β -Propionsäure in 20 ml Pyridin/H₂O (1/1)

Lösung B: 200 mg (1000 μ mol) EDC in 10 ml Pyridin/H₂O (1/1)

Lösung C: 328 mg (5,5 μ mol) BSA in 20 ml H₂O

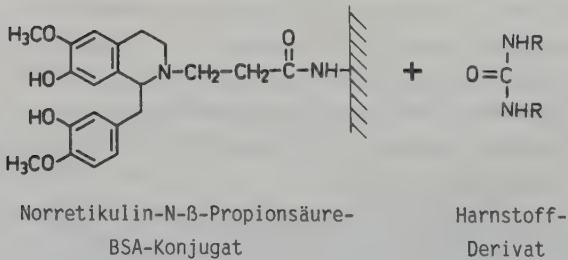
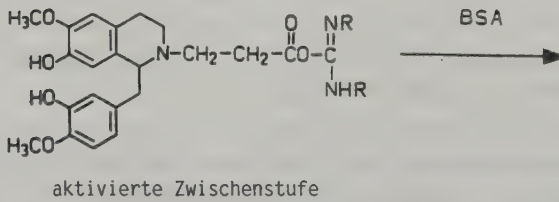
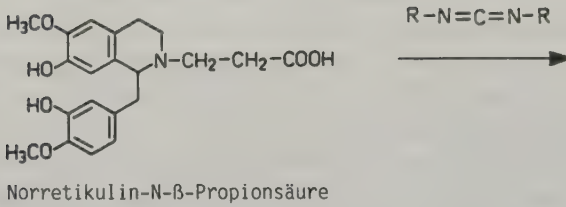
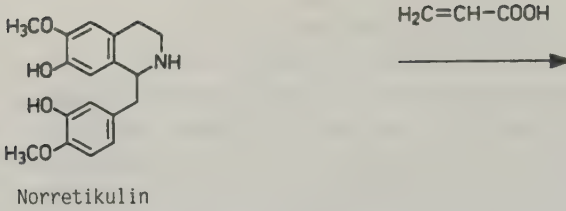


Abb. 7: Darstellung der Norretikulin-N-β-Propionsäure-BSA-Konjugate. Norretikulin wurde in die Reaktion jeweils in optisch reiner Form, als (S)- oder (R)-Enantiomer (vgl. Abb. 2) eingesetzt

Lösung A wurde unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise zu Lösung B gegeben. Nach 10 Minuten wurde Lösung C ebenfalls tropfenweise zu dem Gemisch von Lösung A und B hinzugefügt und der Reaktionsansatz 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei er sich leicht trübte.

Das Konjugat wurde durch Dialyse (4 Tage bei 4°C gegen entionisiertes Wasser) von noch ungebundenem Hapten gereinigt, anschließend gefriergetrocknet und, wie unter II.7. beschrieben, für die Immunisierungen eingesetzt. Die Ausbeute betrug 289 mg für das (S)-Norretikulin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugat und 282 mg für die entsprechende (R)-Norretikulin-Verbindung.

1.2. Wahl geeigneter Testbedingungen

Während die Spezifität eines Radioimmuntests ausschließlich von der Natur der Antikörper abhängt, wird seine Empfindlichkeit von den Eigenschaften des radioaktiv markierten Antigens in großem Maße mitbestimmt: Es sollte eine hohe spezifische Aktivität besitzen, damit bereits die Verdrängung von nur wenigen Molekülen des markierten Antigens durch kleine Mengen der zu messenden Substanz nachgewiesen werden kann.

Für die Markierung von Antigenen sind Nuklide geeignet, mit denen spezifische Aktivitäten von mindestens 1 Ci/mmol erzielt werden können. Andererseits dürfen die Isotope keine kurzen Halbwertszeiten besitzen, damit eine zeit- und materialaufwendige Neusynthese der markierten Verbindungen nur selten erforderlich ist.

Zur Markierung von Antigenen für Radioimmuntests haben sich in erster Linie die Isotope ^3H und ^{125}I bewährt, da sie die zwei genannten Bedingungen erfüllen. Es war vorgesehen, für die Messung von (S)- und (R)-Retikulin ein Tritium-Nuklid in die Antigenmoleküle einzuführen, da eine solche Markierung

zwei wesentliche Vorteile gegenüber der Verwendung von ^{125}J aufweist:

1. Es ist möglich, ^3H -markierte Antigene zu synthetisieren, die mit der zu messenden Substanz strukturell übereinstimmen; dies gewährleistet identische immunologische Eigenschaften beider Verbindungen. Demgegenüber kann bei niedermolekularen Substanzen ein Jod-Atom nicht direkt an das Molekül gekoppelt werden, da es etwa die Ausdehnung eines Benzolkernes besitzt und das Molekül deshalb zu stark verändern würde. Die Einführung von Jod kann nur an einem Hilfsmolekül erfolgen, das an das Antigen geknüpft werden muß. ^{125}J -markierte niedermolekulare Verbindungen unterscheiden sich demnach grundsätzlich strukturell und damit auch in ihren immunologischen Eigenschaften von dem unmarkierten Antigen.

2. Tritium besitzt eine bedeutend längere Halbwertszeit (12 Jahre) als ^{125}J (60 Tage), so daß eine Neusynthese einer ^3H -markierten Verbindung, bedingt durch die Erniedrigung der spezifischen Aktivität, wesentlich seltener erforderlich ist als die einer ^{125}J -markierten Substanz.

Diesen zwei Vorteilen steht ein Nachteil des Tritium-Isotops gegenüber: seine spezifische Aktivität beträgt maximal ca. 30 Ci/mmol, während mit dem ^{125}J -Nuklid spezifische Aktivitäten von 2000 Ci/mmol erzielt werden können.

Die ^3H -Markierung der beiden enantiomeren Retikulin-Antigene erfolgte auf enzymatischem Wege nach einer von STEFFENS (1984) entwickelten Methode. Dieses Verfahren ermöglichte die Darstellung von optisch reinem (S)- und (R)-(NC^3H_3)-Retikulin (vgl. II.5.10.). Damit war eine wesentliche Voraussetzung für einen stereospezifischen Nachweis der beiden Enantiomeren erfüllt.

Unter Benutzung der Tritium-markierten Retikulin-Antigene wurden Bindungstests mit den Antiseren durchgeführt, die nach Immunisierung von Kaninchen mit dem (S)- bzw. (R)-

Norretikulin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugat (vgl. III.1.1.) erhalten worden waren. Es zeigte sich, daß von insgesamt 21 mit dem (S)-Isomer behandelten Tieren nur vier ein Antiserum gebildet hatten, das in den Radioimmuntest eingesetzt werden konnte, da seine Bindung höher als 30 % lag. Weitere fünf Seren wiesen eine Bindung zwischen 10 und 20 % auf; bei allen anderen Tieren wurde keine Bildung von Antikörpern gegen (S)-Retikulin nachgewiesen. Für alle Untersuchungen mit dem (S)-Retikulin-RIA wurde das Antiserum von einem einzigen Kaninchen verwendet. Die Charakterisierung des Testsystems und ein Teil der (S)-Retikulin-Bestimmung von Extrakten wurden mit einem Serum durchgeführt, das nach der 2. Boosterinjektion (vgl. II.7.) gewonnen worden war. Für weitere Messungen wurde ein Gemisch von Antiserumfraktionen eingesetzt, die nach der 3., 5., 8., 10. und 12. Boosterinjektion erhalten worden waren. Vor der Verwendung dieser Fraktionen war sichergestellt worden, daß sie sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Empfindlichkeit nicht von dem zur Charakterisierung des Radioimmuntests benutzten Antiserum unterschieden.

Mit dem (R)-Norretikulin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugat sind 14 Kaninchen immunisiert worden. Von ihnen bildeten 7 Tiere ein Antiserum, dessen Bindung höher als 30 % lag. Das für alle radioimmunologischen Bestimmungen von (R)-Retikulin benutzte Serum stellte ein Gemisch der Antiserumfraktionen eines Tieres dar, die nach der 3.-14. Blutentnahme erhalten worden waren.

Mit den bindungsfähigen Antiseren und den Tritium-markierten Antigenen waren die wichtigsten Voraussetzungen für die Radioimmuntests zur Bestimmung von (S)- und (R)-Retikulin geschaffen. Die Empfindlichkeit und vor allem die Reproduzierbarkeit eines Testsystems sind jedoch darüber hinaus von verschiedenen Bedingungen abhängig, die für jeden RIA neu optimiert werden müssen. Hierzu gehören der pH-Wert der Inkubationslösung und die Methode zur Trennung der gebundenen und

ungebundenen Antigenmoleküle. Beide Parameter wurden für die (S)- und (R)-Retikulin-Tests optimiert.

In Abbildung 8 ist die pH-Abhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion für den (S)- und (R)-Retikulin-RIA dargestellt. Es zeigt sich, daß beim Test für das (S)-Enantiomer die maximale Bindung bei pH-Werten zwischen 5 und 6 erreicht wird. Niedrigere pH-Werte führen zu einer drastischen Erniedrigung der spezifischen Bindung. Im alkalischen Bereich ist die Bindung nur geringfügig geringer oder ebenso hoch; da jedoch bei hohen pH-Werten die unspezifische Bindung ansteigt, wurde in alle weiteren Tests 0,07 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 -Puffer, pH 5,7 eingesetzt. Im (R)-Retikulin-RIA zeigt sich eine optimale Antigen-Antikörper-Reaktion über einen weiten pH-Bereich zwischen 5,5 - 10. Darüberhinaus erweist sich auch die unspezifische Bindung als pH-unabhängig, so daß für dieses Testsystem phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, als Puffersystem ausgewählt wurde. Dieser Puffer stimmt im pH- und osmotischem Wert mit Blutserum überein und gewährleistet deshalb eine hohe Stabilität der Antikörper.

Zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Antigen hat sich bei Radioimmuntests niedermolekularer Substanzen eine Ausfällung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Ammoniumsulfat bewährt (CHARD et al., 1971; WEILER, 1977). Diese Methode sollte auch für alle in dieser Arbeit beschriebenen Tests verwendet werden. Da die Ausfällung einer Substanz mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sehr stark von ihrem Ladungszustand abhängt, muß für jeden Radioimmuntest die optimale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration ermittelt werden. Abbildung 9 zeigt, daß im (S)-Retikulin-RIA eine maximale Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit einer 42 %-igen Ammoniumsulfat-Sättigung der Reaktionsansätze erreicht werden kann. Höhere Salzkonzentrationen führen sowohl zu einem Anstieg der unspezifischen Fällung des markierten Antigens als auch zu einem Abfall der spezifischen Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe. Um eine 42 % gesättigte

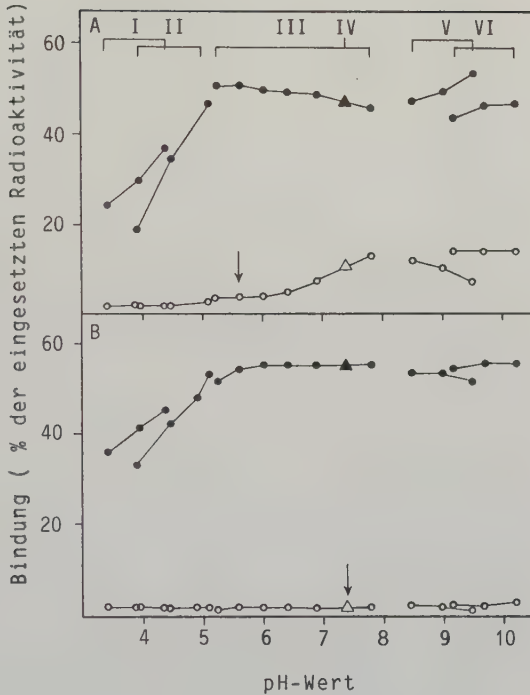


Abb. 8: Bindung des markierten Antigens an den Antikörper in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationslösung, A: im (S)-Retikulin-, B: im (R)-Retikulin-RIA. I. 0,1 M Natrium-Citrat-HCl, II. 0,1 M Acetat-NaOH, III. 0,07 M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, IV. phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl), V. 0,1 M Tris-HCl, VI. 0,1 M Glycin-NaOH. ● spezifische Bindung in Anwesenheit vom Antikörper, ○ unspezifische Bindung in Abwesenheit von Antikörper. Die optimalen pH-Werte sind jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet.

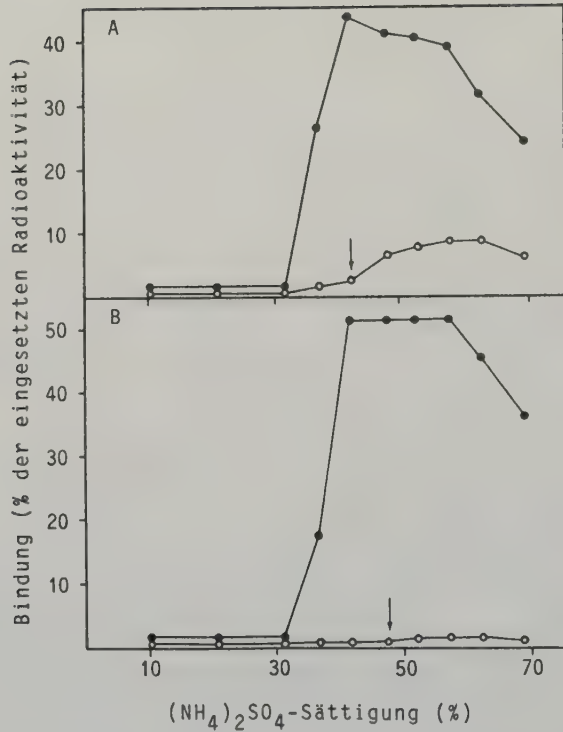


Abb. 9: Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes (●) und unspezifische Fällung des markierten Antigens (○) in Abhängigkeit von der (NH₄)₂SO₄-Sättigung im A: (S)-Retikulin- und B: (R)-Retikulin-RIA. Verwendung von 0,07 M KH₂PO₄-Na₂HPO₄-Puffer, pH 5,7 (A) bzw. phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4 (B) in der Inkubationslösung. Durchführung der Tests wie unter II.8. beschrieben. Die Pfeile kennzeichnen die optimale (NH₄)₂SO₄-Konzentration der Reaktionsansätze.

Reaktionslösung zu erhalten, muß zu den Inkubationsansätzen (vgl. II.8.) 1 ml einer 80 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gegeben werden. Die optimale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration für den (R)-Retikulin-RIA lag in einem Bereich zwischen 42 % und 57 % Sättigung (Abb. 9). Bei diesem Test wurde deshalb die Fällung mit 1 ml einer 91 % gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung durchgeführt, das entspricht einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Endkonzentration in den Reaktionsansätzen von 48 %.

Obwohl die zwei Retikulin-Enantiomeren sich nur in der Konfiguration eines C-Atoms unterscheiden, wurden für die Radioimmuntests der beiden Substanzen sowohl verschiedene pH-Optima als auch abweichende optimale Ammoniumsulfat-Konzentrationen zur Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe ermittelt. Dies demonstriert anschaulich die Notwendigkeit, den Einfluß dieser Parameter bei der Entwicklung eines jeden Radioimmuntests zu untersuchen. Alle weiteren Testbedingungen konnten von anderen Testsystemen übernommen werden (WEILER, 1977; ARENS, 1979). Sie wurden bereits unter II.8. aufgeführt.

1.3. Eigenschaften der (S)- und (R)-Retikulin-Antiseren

Zur Charakterisierung eines Antiserums ist es erforderlich, eine Verdünnungskurve = Titerkurve aufzunehmen. Hierzu werden unter den optimierten Testbedingungen steigende Verdünnungen des Serums mit konstanten Mengen des markierten Antigens inkubiert. Es wird jeweils die prozentuale Bindung, bezogen auf die eingesetzte Gesamtradioaktivität ermittelt. Die Auftragung der Bindungsrate gegen die Serumverdünnung ergibt die Titerkurve. Sie ist in Abbildung 10 für die Antiseren gegen (S)- und (R)-Retikulin dargestellt. Aus dieser Titerkurve läßt sich die für den Test notwendige Serumverdünnung, der Titer, ablesen. Der Titer wird so gewählt, daß in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen 30 - 50 % des markierten Antigens gebunden werden. Unter diesen Bedingungen

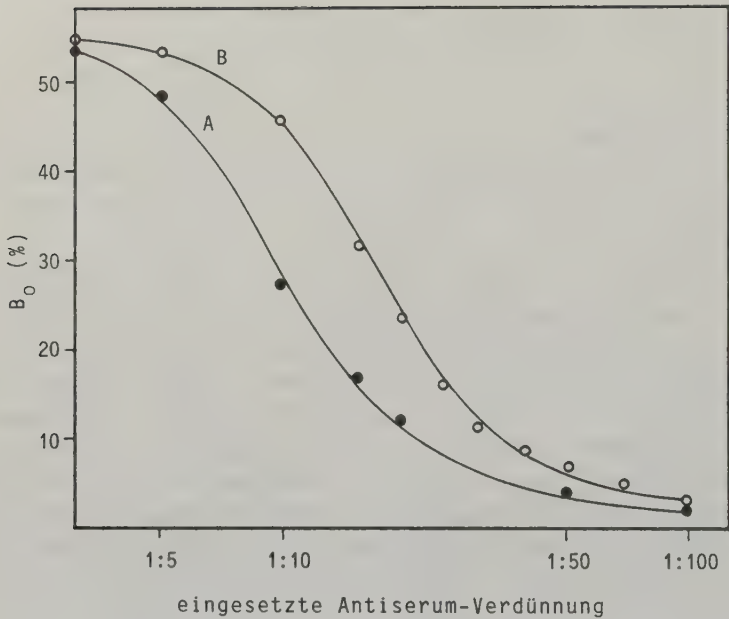


Abb. 10: Titerkurven der (S)-Retikulin-(A) und (R)-Retikulin-(B) Antisera.

liegt der Antikörper gegenüber dem markierten Antigen im Unterschuß vor. Dies impliziert eine optimale Empfindlichkeit des Testsystems; bereits geringe Mengen des unmarkierten Antigens können eine Verdrängung der markierten Verbindung aus dem Antigen-Antikörper-Komplex bewirken, da keine freien Antikörper zur Verfügung stehen.

Für das Antiserum gegen (S)-Retikulin ergab sich ein Titer von 1:8 bei einer Bindung von 37,5 %; das entspricht einer Serumdilution im Test von 1:72 (vgl. 11.8.). Für

das (R)-Retikulin-Serum betrug der Titer 1:20 bei einer Bindung von 25 %, entsprechend einer Endverdünnung im Testansatz von 1:180.

Weitere charakteristische Kenngrößen eines Antiserums sind die Gleichgewichtskonstante K der Antigen-Antikörper-Reaktion und die Konzentration der Antikörperbindungsstellen $\{AK_0\}$. Die Gleichgewichtskonstante ist ein Maß für die Affinität zwischen dem Antigen und dem Antikörper und hat demnach einen Einfluß auf die Empfindlichkeit eines Testsystems. Darüber hinaus ist der Titer eines Antiserums sowohl mit der Affinitätskonstanten als auch mit der Zahl der Bindungsstellen korreliert. Um die Werte für K und $\{AK_0\}$ zu bestimmen, wurde eine konstante Menge an Antikörper (Serumverdünnung 1:8 im (S)-Retikulin-RIA und 1:20 im (R)-Retikulin-RIA) mit steigenden Mengen an markiertem Antigen inkubiert und die Bindung, bezogen auf die jeweils eingesetzte Gesamtradioaktivität, ermittelt (vgl. II.9.). Hieraus wurde einmal das Verhältnis der Anteile von gebundenem und freiem Antigen für die einzelnen Ansätze berechnet (B/F); daneben wurde über die insgesamt eingesetzte Antigenmenge die Konzentration an gebundenem Antigen bestimmt ($\{B\}$). Zwischen B/F und $\{B\}$ besteht nun folgende Beziehung:

$$B/F = K \cdot \{AK_0\} - K \cdot \{B\}.$$

Trägt man B/F gegen $\{B\}$ auf (SCATCHARD, 1949; RODBARD et al., 1969), ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Gleichgewichtskonstanten K und deren x-Achsenabschnitt $\{AK_0\}$ entspricht (Abb. 11).

Die Nicht-Linearität einer solchen Auftragung für das (S)-Retikulin-Antiserum zeigt, daß es mehrere Antikörper-Populationen mit unterschiedlichen Affinitäten enthält. Seine maximale Gleichgewichtskonstante wurde zu $2,5 \times 10^9$ l/mol bestimmt. Das (R)-Retikulin-Serum scheint dagegen nur durch eine Antikörper-Population gekennzeichnet zu sein; sein K -Wert beträgt $0,4 \times 10^9$ l/mol. Beide K -Werte zeigen eine hohe

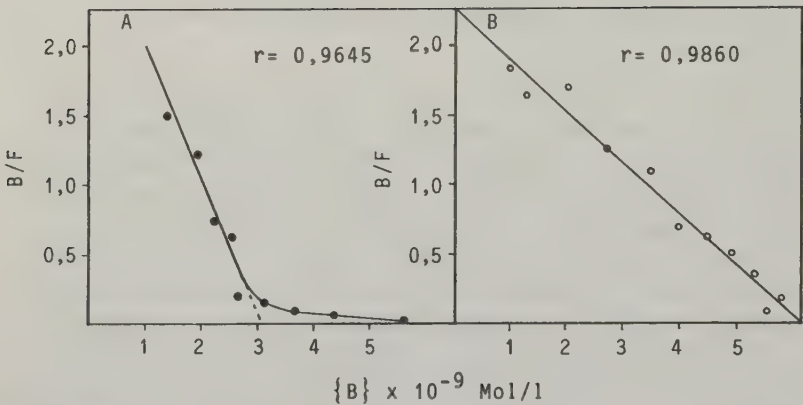


Abb. 11: Die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen bei steigenden Mengen markierten Antigens und konstanter Antiserumverdünnung (1:8 im (S)- und 1:20 im (R)-Retikulin-RIA), aufgetragen nach SCATCHARD (1949). A: (S)-Retikulin-, B: (R)-Retikulin-Antiserum. Die Ansätze enthielten kein unmarkiertes Antigen.

Affinität des Antigens zum Antikörper an.

Als Konzentration der Antikörper-Bindungsstellen, jeweils bezogen auf das unverdünnte Serum, wurden 6 nmol/l für das (S)- und 60 nmol/l für das (R)-Retikulin-Antiserum ermittelt.

1.4. Standardisierung der Tests

Die Quantifizierung der beiden Retikulin-Enantiomeren erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, die bei jedem Test erstellt wurde. Hierzu wurden, unter optimierten Reaktionsbedingungen, steigende bekannte Mengen des unmarkierten (S)- bzw. (R)-Retikulins mit konstanten Mengen an markiertem Anti-

gen und Antiserum inkubiert. Anhand der Radioaktivitätsabnahme der Antigen-Antikörper-Komplexe kann eine Standardkurve erstellt werden. Es gibt eine Anzahl von Möglichkeiten, die Standardkurven-Daten graphisch darzustellen (vgl. LÜBKE und NIEUWBOER, 1978). Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Tests wurde die Antigenmenge logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen. Auf der Ordinate wurden in der nicht-linearen Darstellung der Kurve die relativen prozentualen Bindungen (B/B_0 (%); vgl. II.9.) und in der linearen Darstellung die $\text{logit}\{B/B_0\}$ -Werte (vgl. II.9.) eingesetzt. Die Berechnung der Meßwerte anhand der Standardkurve erfolgte wie unter II.9. angegeben.

Aus einer Standardkurve lassen sich folgende charakteristischen Parameter eines Radioimmuntests ablesen:

- Die Nachweisgrenze, die definiert ist als die Antigenmenge, die $B/B_0 = 100 \% - 3 \times s_{100} \%$ entspricht ($s_{100} \% =$ Standardabweichung von B/B_0 bei $B = B_0$) (vgl. WEILER, 1977).
- Der Meßbereich; es ist der Bereich der Kurve, der durch die logit-Transformation linearisiert werden kann.
- Die Antigenmenge bei $B/B_0 = 50 \%$, d.h. die Menge, die 50 % des markierten Antigens, das in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen gebunden ist, vom Antikörper verdrängt.
- Die unspezifische Bindung
- Die Steigung der logit-Geraden; sie gibt einen Hinweis auf die Präzision eines Tests.

Die Standardkurven für (S)- und (R)-Retikulin sind in Abbildung 12 dargestellt; ihre Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Aus ihnen geht hervor, daß die beiden Tests den Nachweis der Retikulin-Enantiomeren im femtomol-Bereich erlauben; ihr Meßbereich deckt jeweils zwei Größenordnungen ab, wobei der (S)-Retikulin-RIA um etwa den Faktor 2 - 4 empfindlicher ist.

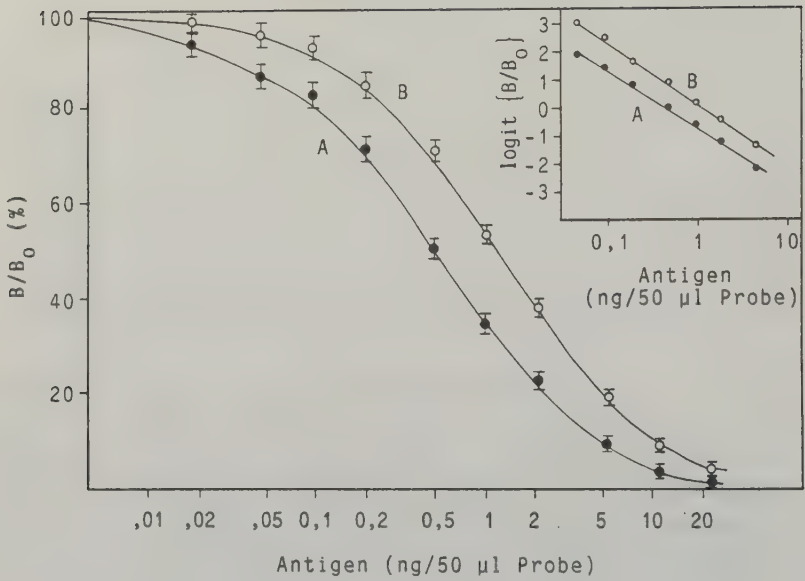


Abb. 12: Standardkurven von (S)-Retikulin (A) und (R)-Retikulin (B) in zwei möglichen Auftragungen.

	(S)-Retikulin	(R)-Retikulin
Nachweisgrenze	0,020 ng $\cong$ 55 fmol	0,075 ng $\cong$ 205 fmol
Messbereich	0,05 - 5 ng	0,10 - 10 ng
B/B ₀ = 50 %	0,51 ng	1,19 ng
UB-Werte	1,5 %	2,0 %
Steigung der logit-Geraden	-2,09	-2,28

Tabelle 3: Parameter zur Beschreibung der (S)- und (R)-Retikulin-Standardkurven

2. Aufbau des Salutaridin-Radioimmuntests

2.1. Kopplung von Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)oxim an BSA

Da Salutaridin, ebenso wie Retikulin, ein zu geringes Molekulargewicht besitzt, um selbst immunogen zu wirken, erforderte die Erzeugung von Antikörpern gegen die Substanz zunächst ihre Kopplung an ein Protein. Salutaridin besitzt eine Ketofunktion, so daß eine Verknüpfung der Verbindung mit den Aminogruppen des Proteins möglich wäre. Eine solche direkte Kopplung ist jedoch häufig mit einem Verlust an Spezifität verbunden. Daher erschien es erfolgversprechender, einen Carboxylgruppen-tragenden Rest an das Alkaloid zu binden, der eine indirekte Verknüpfung mit einem Protein gestattete. Hier bot sich eine Methode an, die z. B. bei Konjugatsynthesen einiger Steroid-Hormone (BAUMINGER *et al.*, 1974) oder des Triterpens Limonin (MANSELL und WEILER, 1980)

eingesetzt worden ist: die Kondensation der Ketofunktion mit Aminoxyessigsäure zum entsprechenden O-Carboxymethyl-Oxim (Abb. 13). Auf diese Weise konnte, ausgehend von Salutaridin, in einer 1-Schritt-Synthese, eine Carboxylgruppe in das Molekül eingeführt werden. Gleichzeitig blieben charakteristische Strukturmerkmale des Alkaloids, wie das Methylierungsmuster an den Ringen A und C (vgl. Abb. 13) im Derivat unverändert erhalten.

Die Darstellung des Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxims wurde wie unter II.5.2. beschrieben durchgeführt. Um es über eine Amidbindung kovalent an BSA zu binden, wurde, wie bei den Konjugaten der anderen Alkaloide, die Carbodiimid-Methode herangezogen (Abb. 13). Bei diesem Verfahren können jedoch die Reaktionsbedingungen in verschiedener Weise variiert werden: So können, wie bei der Darstellung der Retikulin-Immunogene (vgl. III.1.1.), zunächst die Säure und das Carbodiimid-Derivat zusammengegeben werden, um die aktivierte Zwischenstufe (vgl. Abb. 7) zu bilden, bevor das Protein hinzugefügt wird. Andererseits ist es ebenso möglich, die Reaktion mit allen drei Reaktanden gleichzeitig ablaufen zu lassen, wie bei der Kopplung der Thebain-, Codein- und Morphin-N- β -Propionsäuren (vgl. II.5.9.). Die Darstellung des Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxim-BSA-Konjugats wurde herangezogen, um die beiden Variationen der Carbodiimid-Methode vergleichend gegenüberzustellen. Sie wurde nach folgenden zwei Vorschriften durchgeführt:

I. (nach ARENS, 1979)

Lösung A: 22 mg (55 μ mol) Salutaridin-7-(0-carboxymethyl) Oxim in 5 ml Pyridin/H₂O (1/1).

Lösung B: 50 mg (250 μ mol) EDC in 2,5 ml Pyridin/H₂O (1/1)

Lösung C: 83 mg (1,4 μ mol) BSA in 5 ml H₂O

Unter Rühren bei Raumtemperatur wurde Lösung B tropfenweise zu Lösung A gegeben, der Ansatz 10 Minuten inkubiert und anschließend langsam Lösung C hinzugefügt. Nach 18-

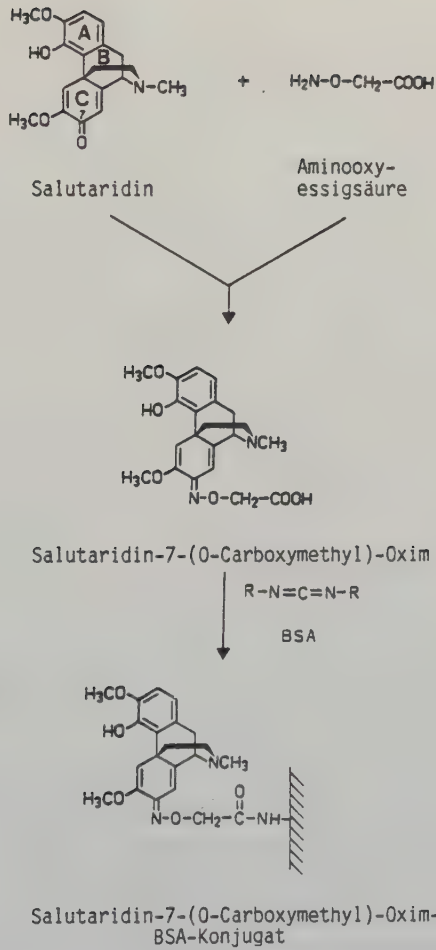


Abb. 13: Synthese eines Konjugates für den Salutaridin-Radioimmunttest.

stündiger Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch vier Tage gegen H_2O dialysiert und das saubere Konjugat anschließend gefriergetrocknet. Seine Ausbeute betrug 82 mg.

- II. Eine Lösung von 28 mg (70 μ mol) Salutaridin-7-(0-carboxymethyl)Oxim und 92 mg (1,5 μ mol) BSA in 5 ml H_2O wurde mit 0,1 M $NaHCO_3$ auf pH 7,7 eingestellt und 480 mg (2400 μ mol) EDC in drei Portionen hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde insgesamt 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4-tägiger Dialyse gegen H_2O und Gefriertrocknung konnten 83 mg des sauberen Salutaridin-7-(0-carboxymethyl) Oxim-BSA-Konjugats gewonnen werden.

Die mit den zwei Methoden hergestellten Konjugate wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, wie unter II.7. beschrieben.

2.2. Synthese von (7- 3H)-Salutaridinol I und II

Salutaridin kann chemisch durch Reduktion mit Natriumborhydrid in die beiden epimeren Alkohole Salutaridinol I und II überführt werden (BARTON et al., 1965b). Setzt man bei dieser Reaktion statt $NaBH_4$ radioaktives NaB^3H_4 ein, so läßt sich Salutaridinol am C-Atom 7 mit einem 3H -Isotop markieren (BARTON et al., 1965b; Abb. 14). Die beiden Epimeren (7- 3H)-Salutaridinol I und II können als markiertes Antigen in den Salutaridin-RIA eingesetzt werden, obwohl sie sich vom unmarkierten Antigen unterscheiden. Dies ist deshalb möglich, weil die Antikörper die spezifische Struktur des Salutaridins am C-Atom 7 nicht erkennen können, da auch das Immunogen in dieser Position gegenüber dem Salutaridin verändert ist (vgl. Abb. 12).

Die Darstellung von (7- 3H)-Salutaridinol I und II wurde in Anlehnung an BARTON et al. (1965b) folgendermaßen durchgeführt:

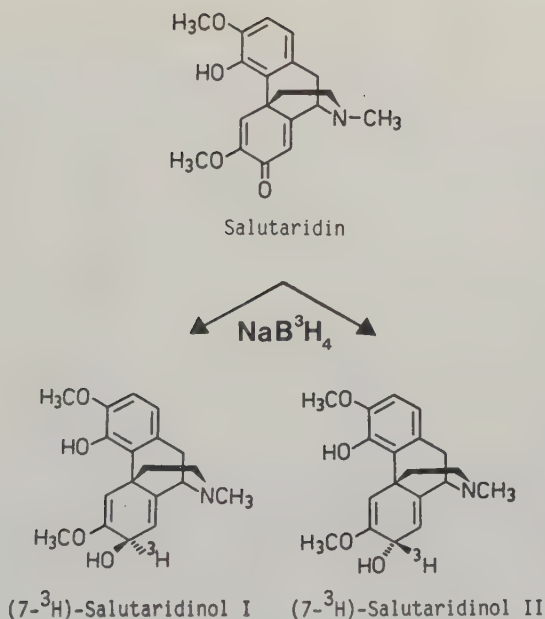


Abb. 14: Darstellung von (7-³H)-Salutaridinol I und II

Eine gekühlte Lösung von 14 mg (43 µmol) Salutaridin in 0,6 ml absolutem Äthanol wurde in eine im Eis gehaltene Ampulle mit 0,31 mg (8 µmol) NaB³H₄ (100 mCi; spez. Akt: 12,4 Ci/mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 0°C und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdampft, der Rückstand in 0,2 ml H₂O aufgenommen und fünfmal mit 1 ml CHCl₃ extrahiert. Nach Dünnschichtchromatographie der vereinigten CHCl₃-Phasen (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 8; R_f (Salutaridin)= 0,61) ergab sich die in Abbildung 15 darge-

stellte Radioaktivitätsverteilung. Die markierten Produkte

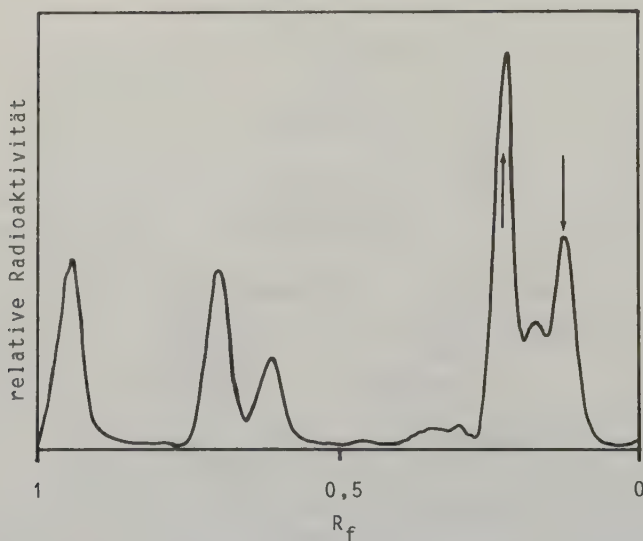


Abb. 15: Radioaktivitätsverteilung nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 8) des CHCl_3 -Extraktes eines Reaktionsansatzes zur Reduktion von Salutaridin mit NaBH_4 . Die mit Pfeilen markierten Banden wurden jeweils eluiert.

mit den R_f -Werten 0,10 und 0,23 wurden jeweils mit Methanol eluiert, da sie mit authentischem Salutaridinol II und I (vgl. II.5.11.) korrespondierten. Die Eluate wurden einer zweiten dünnsschichtchromatographischen Reinigung unterworfen (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 9; R_f (Salutaridin) = 0,71,

Rf (Salutaridinol I)= 0,44, Rf (Salutaridinol II)= 0,66), nach der 1,3 mCi ($7\text{-}^3\text{H}$)-Salutaridinol I und 1,2 mCi ($7\text{-}^3\text{H}$)-Salutaridinol II gewonnen werden konnten; dies entspricht insgesamt 2,5 % der eingesetzten Radioaktivität.

Die zwei markierten Produkte erwiesen sich in 5 Laufmittelsystemen als sauber (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 7; Rf (Salutaridin)= 0,32, Rf (Salutaridinol I)= 0,36, Rf (Salutaridinol II)= 0,24; Laufmittelsystem 12; Rf (Salutaridin)= 0,61, Rf (Salutaridinol I)= 0,24, Rf (Salutaridinol II)= 0,16; Laufmittelsystem 13; Rf (Salutaridin)= 0,46, Rf (Salutaridinol I)= 0,57, Rf (Salutaridinol II)= 0,50; Laufmittelsystem 14; Rf (Salutaridin)= 0,57, Rf (Salutaridinol I)= 0,15, Rf (Salutaridinol II)= 0,10; Laufmittelsystem 15; Rf (Salutaridin)= 0,44, Rf (Salutaridinol I)= 0,07, Rf (Salutaridinol II)= 0,07). Sie zeigten dort eine einheitliche Radioaktivitätsverteilung; ihre Rf-Werte stimmten jeweils mit denen der beiden authentischen epimeren Alkohole (vgl. II.5.11.) überein.

2.3. Wahl geeigneter Testbedingungen

Mit den zwei Salutaridin-Konjugaten, die wie unter III.2.1. beschrieben dargestellt worden waren, wurden jeweils drei Kaninchen immunisiert. Die gewonnenen Antiseren wurden, unter Benutzung der zwei radioaktiven isomeren Alkohole als markierte Antigene, in Bindungstests untersucht. Hierbei ergab sich, daß in allen Seren Antikörper gegen Salutaridin vorhanden waren, unabhängig davon, nach welcher Methode im verwendeten Immunogen das Hapten an das Protein gekoppelt worden war (vgl. III.2.1.). Darüber hinaus lieferten die Tests mit ($7\text{-}^3\text{H}$)-Salutaridinol I und II übereinstimmende Bindungswerte. Für alle weiteren Untersuchungen wurde das Antiserum eines Kaninchens benutzt, das nach der 1. Blutentnahme gewonnen worden war. Als markiertes Antigen fand

(7-³H)-Salutaridinol I Verwendung, falls nicht für einen Vergleich beide Verbindungen eingesetzt wurden (vgl. III.2.4.).

Wie bei den Retikulin-Radioimmuntests wurden auch beim Salutaridin-RIA die optimalen Testbedingungen ermittelt. Abbildung 16 zeigt die Abhängigkeit der Bindung des markierten Antigens an den Antikörper vom pH-Wert der Inkubationslösung. Im sauren pH-Bereich liegt eine geringe spezifische Bindung vor; sie steigt mit zunehmenden pH-Werten allmählich an und bleibt in einem weiten pH-Bereich zwischen 7 und 11 unverändert hoch. Die unspezifische Bindung beträgt bei allen untersuchten pH-Werten konstant 1 - 2 %. Für die radioimmunologische Bestimmung des Salutaridins wurde phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, eingesetzt.

Eine optimale Fällung der Salutaridin-Antikörper-Komplexe kann mit 50-70 % gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung erreicht werden (Abb. 17). In diesem Bereich ist darüber hinaus die unspezifische Fällung des markierten Antigens gering, so daß im Salutaridin-Test die Reaktionsansätze zur Fällung 52 %-ig mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gesättigt wurden; das entspricht der Zugabe von 1,2 ml einer 91 % gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung zu den Inkubationsansätzen (vgl. II.8.).

Die Inkubations- und Fällungsdauer wurden, ebenso wie bei den Retikulin-Tests, auch beim Salutaridin-RIA auf jeweils 60 Minuten festgelegt (vgl. II.8.), da sich diese Zeiten aufgrund anderer Untersuchungen (WEILER, 1977; ARENS, 1979) als am günstigsten erwiesen hatten. Die weiteren Testbedingungen sind bereits in Abschnitt II.8. aufgeführt, da sie für alle in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntests einheitlich gelten.

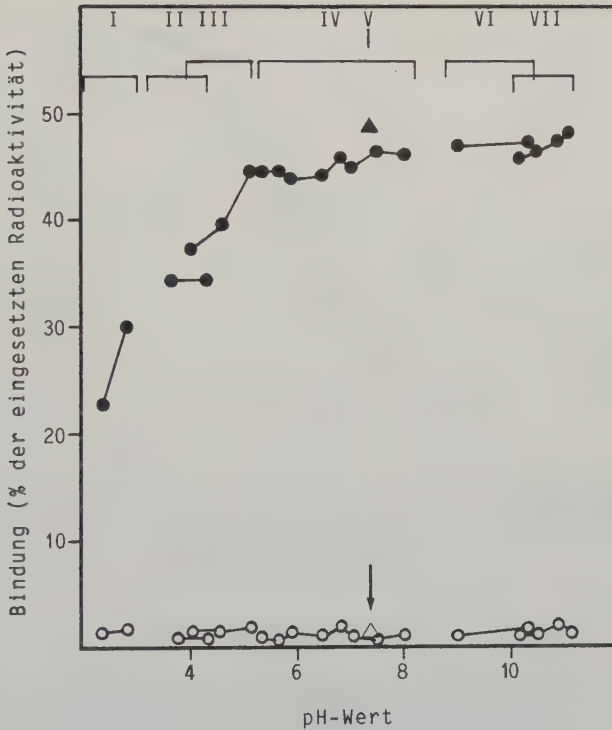


Abb. 16: PH-Abhängigkeit der Bindung von (7-³H)-Salutaridinol I im Salutaridin-Radioimmunttest. I. 0,1 M Glycin-HCl, II. 0,1 M Natrium-Citrat-HCl, III. 0,1 M Acetat-NaOH, IV. 0,07 M KH₂PO₄-Na₂HPO₄, V. phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, VI. 0,1 M Tris-HCl, VII. 0,1 M Glycin-NaOH. ● spezifische Bindung in Anwesenheit von Antikörper, ○ unspezifische Bindung in Abwesenheit von Antikörper. Der für folgende Tests benutzte pH-Wert ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

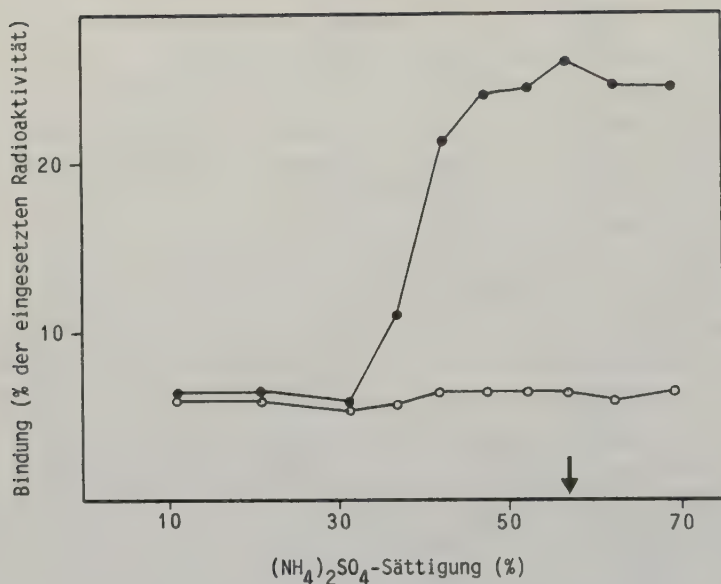


Abb. 17: Abhängigkeit der Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes (●) und der unspezifischen Fällung von (7-³H)-Salutaridinol I (o) von der (NH₄)₂SO₄-Sättigung der Reaktionsansätze im Salutaridin-RIA. Verwendung von phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4, in der Inkubationslösung. Der Pfeil markiert die für weitere Tests eingesetzte Ammoniumsulfat-Sättigung.

2.4. Charakterisierung des Salutaridin-Antiserums

Abbildung 18 zeigt die Titerkurve des Antiserums, das für alle Salutaridin-Bestimmungen benutzt wurde. Sie wurde wie unter III.1.3. angegeben erstellt, wobei die beiden tritium-markierten Salutaridinol-Epimere als Antigene eingesetzt wurden. Die immunologischen Eigenschaften der zwei Verbin-

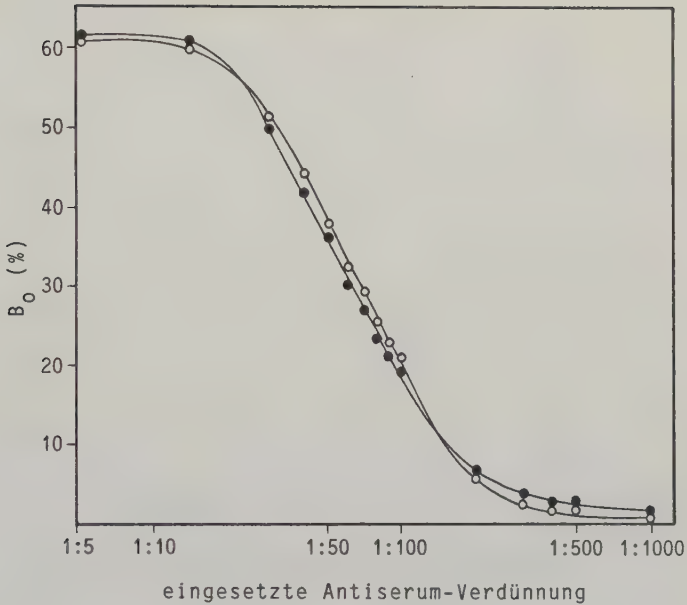


Abb. 18: Titerkurven des Salutaridin-Antiserums unter Verwendung von (7-³H)-Salutaridinol I (●) und (7-³H)-Salutaridinol II (○) als markiertes Antigen.

ditionen sind nahezu identisch. Bei einer Bindung von 30 % betrug der Titer 1:60 bei Verwendung von (7-³H)-Salutaridinol I (Serumendverdünnung im Test 1:540) und 1:65, wenn (7-³H)-Salutaridinol II als markiertes Antigen diente.

Aus der Auftragung nach SCATCHARD (1949) (Abb. 19) ließ sich für das unverdünnte Salutaridin-Antiserum eine Antikörperkonzentration von 162 nmol/l und eine maximale Affinitätskonstante von $0,9 \times 10^9$ l/mol ermitteln.

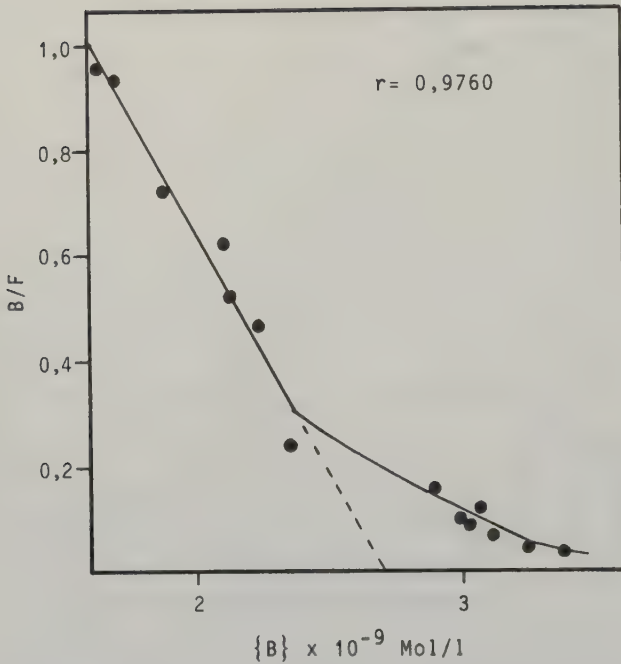


Abb. 19: Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen bei Variation der Menge markierten Antigens ((7-³H)-Salutaridinol I. Das Antiserum wurde in alle Ansätze 1:60 verdünnt eingesetzt. Auftragung nach SCATCHARD (1949), zur Ermittlung von K und {AK₀}.

2.5. Standardisierung des Salutaridin-Radioimmuntests

Abbildung 20 zeigt die Standardkurve, die mit (7-³H)-Salutaridinol I als markiertem Antigen aufgenommen wurde. In Tabelle 4 sind die Daten zu ihrer Charakterisierung zusammengestellt.

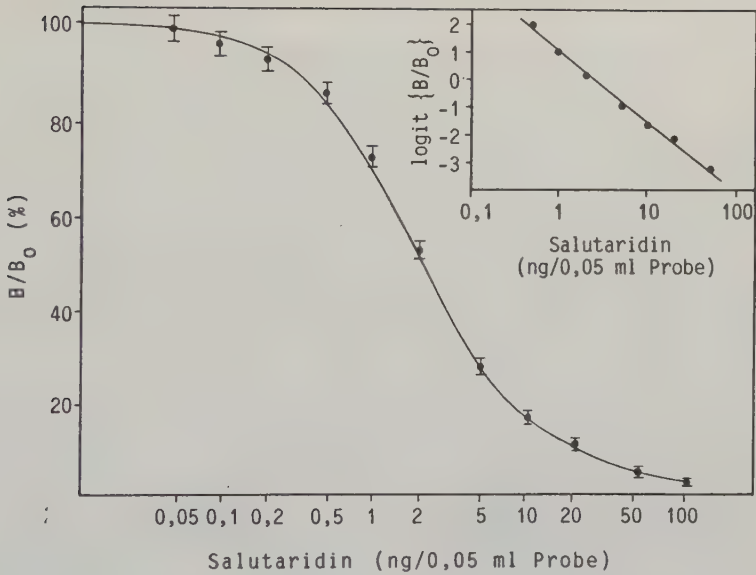


Abb. 20: Standardkurve von Salutaridin in zwei verschiedenen Auftragungen.

Nachweisgrenze	Messbereich	$B/B_0 = 50 \%$	UB-Werte	Steigung der logit-Geraden
0,23 ng = 706 fmol	0,50 - 50 ng	2,12 ng	1,5 %	- 2,54

Tab. 4: Parameter zur Charakterisierung der Salutaridin-Standardkurve.

3. Entwicklung eines Radioimmuntests für Thebain

3.1. Darstellung von (7- ^3H)-Thebain

Mit den (7- ^3H)-Salutaridinol-Epimeren bot sich eine einfache Möglichkeit, tritiummarkiertes Thebain zu erhalten, das als markiertes Antigen in den Thebain-RIA eingesetzt werden konnte. Die Alkohole lagern sich nämlich unter saurer Katalyse sehr schnell zu Thebain um (BARTON et al., 1965; SOHAR und SCHOENEWALDT, 1975), ohne daß in die Umsetzung der Wasserstoff am C-Atom 7 einbezogen wird (Abb. 21) (BARTON et al., 1965). Diese Reaktion wurde zur Darstellung von (7- ^3H)-

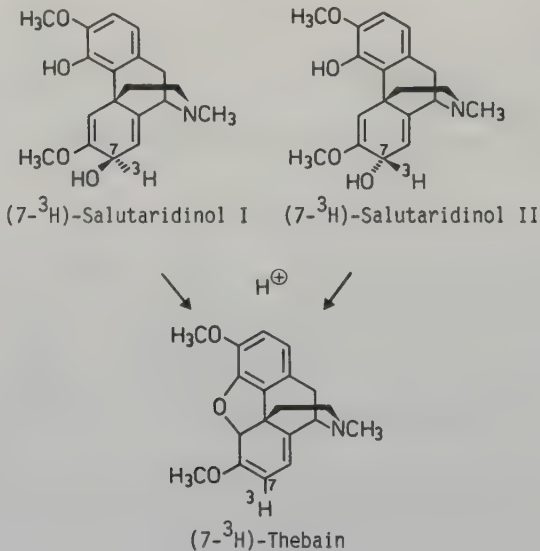


Abb. 21: Darstellung von (7- ^3H)-Thebain

Thebain ausgenutzt, wobei im einzelnen folgendermaßen vorgegangen wurde:

(7-³H)-Salutaridinol I bzw. II (170 µCi; spez. Akt.: 3,1 Ci/mmol) wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten mit 1,2 ml 0,5 N HCl behandelt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz, nachdem er mit 1 ml 1 N NaOH alkalisiert worden war, dreimal mit 5 ml CHCl₃/Isopropanol (3/1) extrahiert. Nach Dünnschichtchromatographie (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 7; Rf (Thebain)= 0,68, Rf (Salutaridinol I)= 0,36, Rf (Salutaridinol II)= 0,24) der vereinigten organischen Phasen zeigte sich in der Radioaktivitätsverteilung ein Hauptprodukt, das mit authentischem Thebain korrespondierte (80 %) und daneben drei weitere Produkte (Rf-Werte= 0 bzw. 0,22 bzw. 0,39; insgesamt 20 %). Das Hauptprodukt wurde mit Methanol eluiert. Die Dünnschichtchromatographie von Aliquots des Eluats in vier weiteren Laufmitteln (vgl. II.6.; Laufmittelsysteme 12, 13, 14, 15; Rf-Werte (Thebain)= 0,59, 0,56, 0,42, 0,40) ergab, daß die Verbindung in allen Fällen mit authentischem Thebain comigrierte und daß sie nicht durch andere radioaktive Substanzen verunreinigt war. (7-³H)-Thebain wurde mit einer Ausbeute von 34 µCi (20 %) erhalten. Seine spezifische Aktivität war mit der des eingesetzten Salutaridinols identisch und betrug 3,1 Ci/mmol.

3.2. Optimierung der Testbedingungen

Mit (7-³H)-Thebain als markiertem Antigen wurden Bindungstests von Antiseren durchgeführt, die von einem Kaninchen stammten, das mit dem Northebain-N-B-Propionsäure-BSA-Konjugat (vgl. II.5.9.) immunisiert worden war. Es stellte sich heraus, daß alle Serumfraktionen, die nach der 1. bis 8. Boosterinjektion (vgl. II.7.) gewonnen worden waren, hohe Bindungswerte von 68-72 % der eingesetzten Radioaktivität aufwiesen. Das nach der 15. Blutentnahme isolierte Antiserum

des Tieres wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten radioimmunologischen Thebain-Bestimmungen eingesetzt.

Die Ermittlung der optimalen Testbedingungen erfolgte auf gleiche Weise wie bei den (S)- und (R)-Retikulin-RIA's (vgl. III.1.2.). Die Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes ergab, daß sowohl die spezifische Bindung des markierten Antigens an den Antikörper als auch die unspezifische Bindung des (7-³H)-Thebains über den gesamten untersuchten pH-Bereich (2-10) konstant waren. Demnach konnte in die Inkubationsansätze phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, eingesetzt werden.

Die Abhängigkeit der Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe von der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration ist in Abbildung 22 dargestellt. Der zur Fällung geeignete Bereich wurde zu 48-62 % Ammoniumsulfatsättigung der Testansätze bestimmt. Hier war die spezifische Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe maximal, während sie sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen deutlich abnahm. Die unspezifische Mitfällung des markierten (7-³H)-Thebains lag im gesamten untersuchten Konzentrations-Bereich unter 2 %. Im Thebain-Radioimmuntest wurden daher standardmäßig die Inkubationsansätze mit 1,2 ml einer 91 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gefällt; das entspricht einer Endsättigung von 52 %.

3.3. Charakterisierung des Thebain-Antiserums

Aus der Titerkurve des Thebain-Antiserums (Abb. 23) ließ sich bei einer Bindung von 36 % ein Titer von 1:300 ermitteln; das entspricht einer Serumendverdünnung in den Testansätzen von 1:2700 (vgl. II.8.). Die Auftragung nach SCATCHARD (Abb. 24) wurde aus den Daten eines Tests erstellt, in dem steigende Mengen des markierten Antigens mit konstanten Antikörper-Mengen (Antiserumverdünnung: 1:300) inkubiert wurden (vgl.

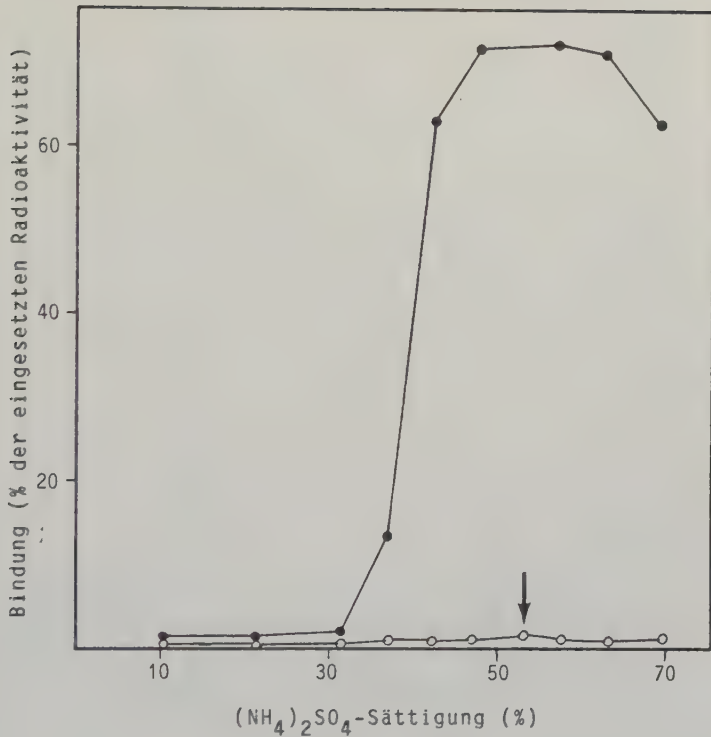


Abb. 22: Fällung von Antigen-Antikörper-Komplexen (●) und unspezifische Fällung des markierten (7-³H)-Thebains (○) in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatsättigung der Testlösung. Die Inkubationsansätze enthielten phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, pH 7,4, als Puffersystem. Der Pfeil markiert die im folgenden zur Fällung verwendete (NH₄)₂SO₄-Konzentration.

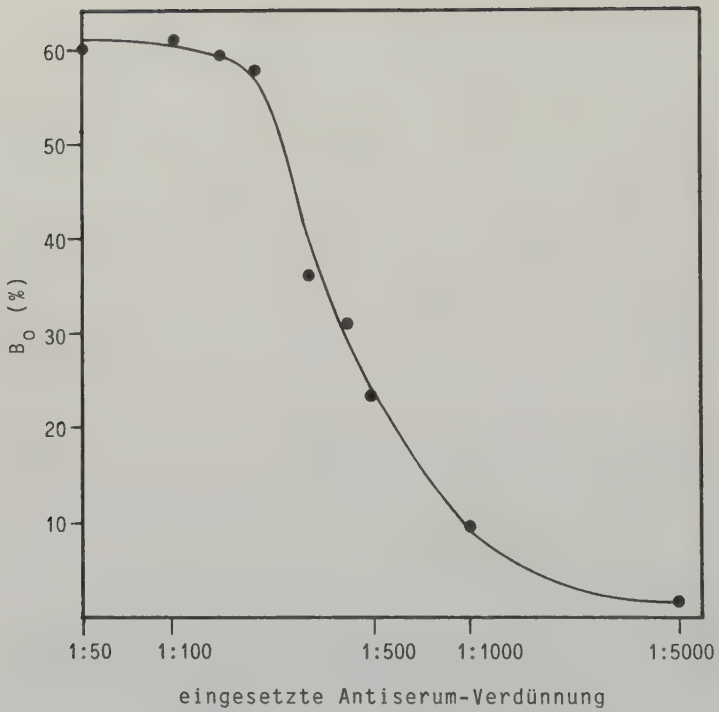


Abb. 23: Titerkurve des Thebain-Antiserums

III.1.3.). Sie lieferte für das Serum eine maximale Affinitätskonstante K von $1,8 \times 10^9$ l/mol. Die Konzentration der Antikörper-Bindungsstellen im unverdünnten Serum betrug 744 nmol/l.

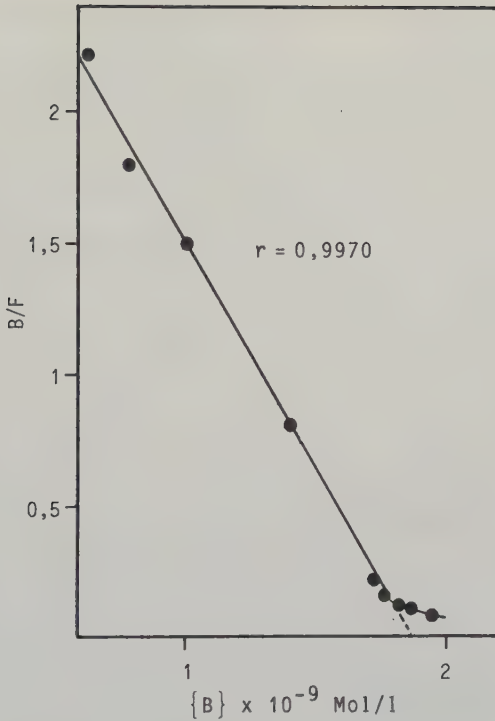


Abb. 24: Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen bei steigenden Mengen von (7-³H)-Thebain und konstanter Antiserumverdünnung (1:300), aufgetragen nach SCATCHARD (1949). Die Ansätze enthielten kein unmarkiertes Antigen.

3.4. Standardisierung des Tests

Die Standardkurve für den Thebain-RIA zeigt Abbildung 25; ihre wichtigsten Parameter sind in Tabelle 5 angegeben.

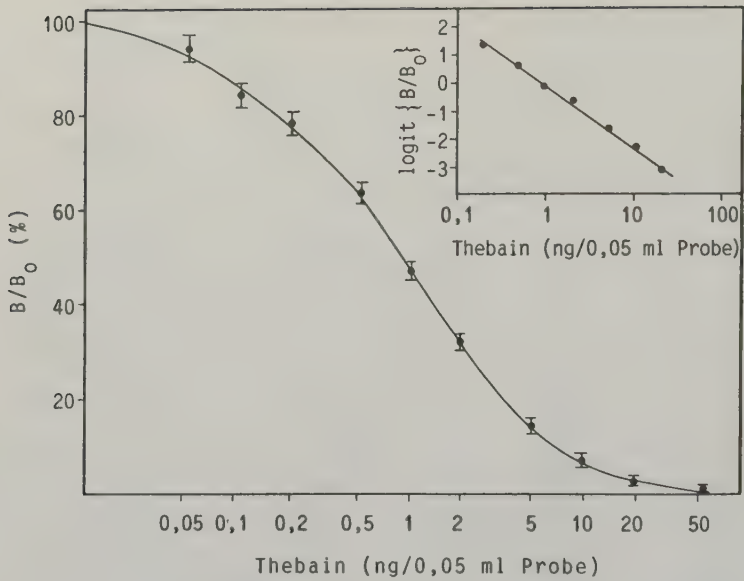


Abb. 25: Standardkurve von Thebain in zwei möglichen Auftragungen

Nachweisgrenze	Messbereich	$B/B_0 = 50 \%$	UB-Werte	Steigung der logit-Geraden
0,055 ng = 183 fmol	0,1 - 10 ng	0,92 ng	1,8 %	- 2,36

Tab. 5: Charakteristische Daten der Thebain-Standardkurve

4. Aufbau von Radioimmuntests für Codein und Morphin

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplanten Untersuchungen von Papaver-Pflanzen und -Zellkulturen war es erforderlich, neben den bereits genannten Substanzen auch die Alkaloide Codein und Morphin radioimmunologisch zu quantifizieren. Hierzu konnten Testsysteme verwendet werden, die von SUND (1978) erarbeitet worden waren. Sie mußten jedoch in verschiedener Weise modifiziert und weitergehender charakterisiert werden.

Die Stimulierung der Bildung von Antikörper gegen Codein und Morphin erfolgte mit Norcodein- bzw. Normorphin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugaten (vgl. II.5.9.). Die Untersuchungen von SUND (1978) hatten bereits gezeigt, daß die mit diesen Konjugaten immunisierten Kaninchen Antiseren produzierten, die einen selektiven und empfindlichen Nachweis der beiden Alkaloide gestatteten. Deshalb wurden auch für die vorliegende Arbeit solche Seren benutzt. Das für alle Codein-Bestimmungen eingesetzte Antiserum stellte ein Gemisch der Serumfraktionen eines Tieres dar, die mit der 1. - 24. Blutentnahme gewonnen worden waren. Das generell verwendete Morphin-Serum enthielt die Blutfraktion 1 - 18 eines Kaninchens.

Als markiertes Antigen fand im Morphin-RIA ein käufliches Morphin-Präparat mit einer Tritiummarkierung am C-Atom 1 (vgl. Abb. 1) Verwendung. Seine spezifische Aktivität betrug 24 Ci/mmol.

4.1. Synthese von (6- ^3H)-Codein

Für die radioimmunologische Bestimmung von Codein wurde (6- ^3H)-Codein als markiertes Antigen eingesetzt. Diese markierte Verbindung konnte durch Reduktion von Codeinon mit NaB^3H_4 dargestellt werden. Bei dieser Reaktion, der Umwand-

lung einer Ketofunktion in eine Hydroxylgruppe, entsteht am C-Atom 6 des Moleküls ein Asymmetriezentrum, so daß theoretisch zwei epimere Alkohole gebildet werden könnten (Abb. 26).

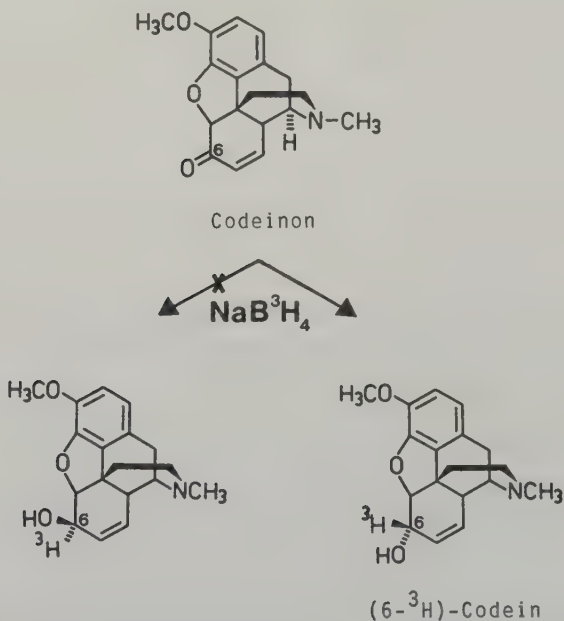


Abb. 26: Reduktion von Codeinon mit NaB^3H_4 zur Darstellung von (6- ^3H)-Codein.

GATES zeigte jedoch (1953), daß die Reaktion mit NaBH_4 als Reduktionsmittel stereospezifisch abläuft und Codein das einzig gebildete Produkt ist.

Die Synthese und Isolierung von (6- ^3H)-Codein wurde fol-

gendermaßen durchgeführt:

4,4 mg (15 μmol) Codeinon in 0,6 ml Äthanol wurden zu einer Suspension von 0,07 mg (1,9 μmol) NaB^3H_4 (150 mCi; spez. Akt.: 77,8 Ci/mmol) in 0,15 ml Äthanol gegeben und das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Seine anschließende Dünnschichtchromatographie (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 9; R_f (Codein) = 0,50, R_f (Codeinon) = 0,7) ergab, daß der R_f -Wert des radioaktiven Hauptprodukts (95 % der Radioaktivität) der Reaktion mit dem authentischen Codeins übereinstimmte. Es wurde eluiert und einer zweiten dünn-schichtchromatographischen Reinigung unterworfen (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 7; R_f (Codein) = 0,42, R_f (Codeinon) = 0,60), um sicherzustellen, daß die markierte Substanz nicht mit unmarkiertem Codeinon kontaminiert ist.

Die Identität der isolierten Verbindung als Codein und seine Sauberkeit wurden durch Chromatographie in vier verschiedenen Laufmitteln überprüft (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 10; R_f (Codein) = R_f (Codeinon) = 0,66; Laufmittelsystem 11; R_f (Codein) = R_f (Codeinon) = 0; Laufmittelsystem 12; R_f (Codein) = 0,71, R_f (Codeinon) = 0,80; Laufmittelsystem 13; R_f (Codein) = 0,40, R_f (Codeinon) = 0,47). Sie korrespondierte in allen Laufmittelsystemen mit Codein und zeigte jeweils eine einheitliche Radioaktivitätsverteilung. Die Ausbeute an (6- ^3H)-Codein wurde zu 64 mCi (43 %) bestimmt.

4.2. Eigenschaften der Codein- und Morphin-Antiseren

Die Verdünnungskurven der Codein- und Morphin-Antiseren, die mit käuflichem (1- ^3H)-Morphin bzw. selbst synthetisiertem (6- ^3H)-Codein (vgl. III.4.1.) als markiertem Antigen unter den optimierten Testbedingungen nach SUND (1978) (vgl. II.8.) aufgenommen wurden, sind in Abbildung 27 dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die Titer der Seren sehr unterschiedlich sind. Das gegen Codein gerichtete Serum konnte, um eine Bin-

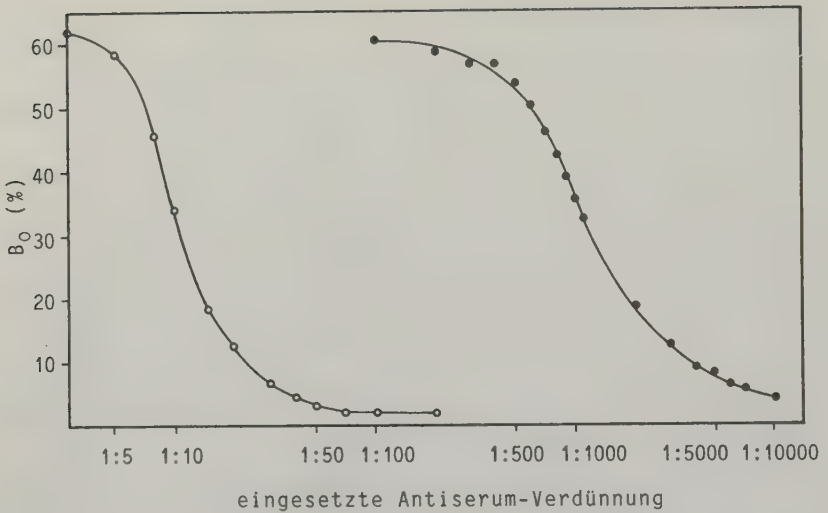


Abb. 27: Verdünnungskurven der Codein- und Morphin-Antiseren

dung von 30 % zu erreichen, 1:1200 verdünnt werden, das Morphin-Serum dagegen nur 1:11.

Die Auftragung nach SCATCHARD (1949) (Abb. 28) lieferte eine maximale Affinitätskonstante K von $8,8 \times 10^9$ l/mol für das Codein- und von $2,3 \times 10^9$ l/mol für das Morphin-Antiserum; die Konzentration der Antikörper-Bindungsstellen wurde zu 380 bzw. 6 nmol/l bestimmt.

4.3. Standardisierung der Radioimmuntests

Die Standardkurven für den Codein- und Morphin-RIA sind in Abbildung 29 wiedergegeben; ihre charakteristischen Parameter faßt Tabelle 6 zusammen.

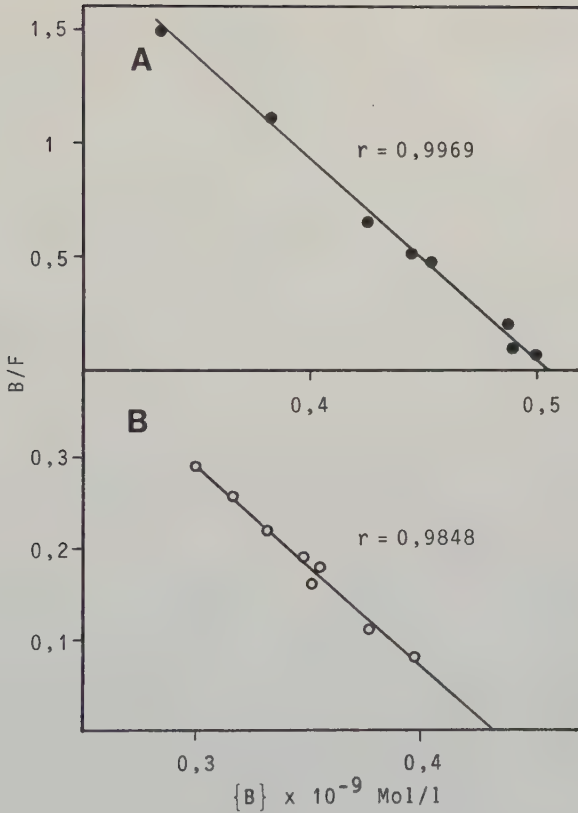


Abb. 28: Die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen bei steigenden Mengen markierten Antigens und konstanter Antiserumverdünnung (1:1200 im Codein- und 1:11 im Morphin-RIA), aufgetragen nach SCATCHARD (1949). A. Codein- B. Morphin-Antiserum. Die Ansätze enthielten kein unmarkiertes Antigen.

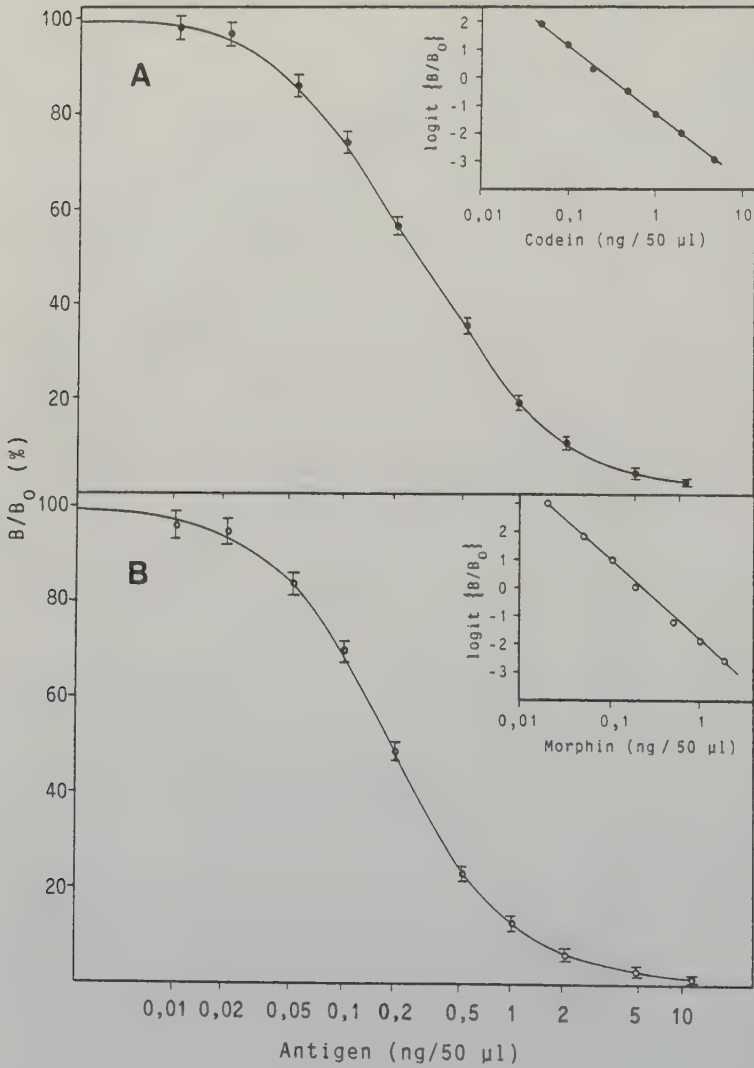


Abb. 29: Standardkurven für Codein (A) und Morphin (B), jeweils in zwei möglichen Auftragungen

	Codein	Morphin
Nachweisgrenze	0,025 ng = 84 fmol	0,024 ng = 84 fmol
Messbereich	0,05 - 5 ng	0,05 - 5 ng
B/B ₀ = 50 %	0,27 ng	0,20 ng
UB-Wert	1,3 %	1,5 %
Steigung der logit-Geraden	- 2,44	- 2,89

Tab. 6: Charakteristische Parameter zur Beschreibung der Standardkurven von Codein und Morphin

5. Zusammenfassung der wichtigsten Testparameter

Die wesentlichen Daten der in dieser Arbeit entwickelten Radioimmunttests für (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Vergleicht man die Parameter, die die Antiseren charakterisieren, so kann man konstatieren, daß alle Affinitätskonstanten etwa in der gleichen Größenordnung liegen, während die Antikörper-Konzentrationen der sechs Seren und damit auch ihre Titer sehr stark variieren. Diese Schwankungen können verschiedene Ursachen haben, da die Immunantwort eines Tieres von vielen Faktoren abhängt. Dies sind unter anderem die Beschaffenheit des Immunogens - z. B. die Anzahl der Haptenmoleküle, die an ein Protein gekoppelt wurden -, die Art der Immunisierung und nicht zuletzt genetisch fixierte Eigenschaften des Versuchstieres, die die Ansprechbarkeit auf ein bestimmtes Immunogen festlegen (HURN und LANDON, 1971).

	S-Retikulin	R-Retikulin	Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
maximale Affinitätskonstante des Serums	$2,5 \times 10^9$ l/mol	$0,4 \times 10^9$ l/mol	$0,9 \times 10^9$ l/mol	$1,8 \times 10^9$ l/mol	$8,8 \times 10^9$ l/mol	$2,3 \times 10^9$ l/mol
Konzentration der Antikörperbindungsstellen des Serums	6 nmol/l	60 nmol/l	162 nmol/l	744 nmol/l	380 nmol/l	6 nmol/l
Serumendverdünnung im Test	1 : 72	1 : 180	1 : 540	1 : 2700	1 : 10800	1 : 99
Menge an markiertem Antigen pro Test	1,4 pmol	3,2 pmol	3,9 pmol	3,1 pmol	0,8 pmol	0,4 pmol
Spezifische Radioaktivität des markierten Antigens	7,5 Ci/ mmol	3,0 Ci/ mmol	3,1 Ci/ mmol	3,1 Ci/ mmol	20 Ci/ mmol	24 Ci/ mmol
Unspezifische Bindung	1,5 %	2,0 %	1,5 %	1,8 %	1,3 %	1,5 %
Nachweisgrenze	0,020 ng = 55 fmol	0,075 ng = 205 fmol	0,230 ng = 706 fmol	0,055 ng = 183 fmol	0,025 ng = 84 fmol	0,024 ng = 84 fmol
Messbereich	0,05–5 ng	0,1–10 ng	0,5–50 ng	0,1–10 ng	0,05–5 ng	0,05–5 ng
B/B ₀ = 50 %	0,51 ng	1,19 ng	2,12 ng	0,92 ng	0,27 ng	0,20 ng
Steigung der logit-Geraden	- 2,09	- 2,28	- 2,54	- 2,36	- 2,44	- 2,89

Tab. 7: Aufstellung der wichtigen Parameter der Radioimmunttests zur Bestimmung von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin.

Die Mengen an markiertem Antigen pro Testansatz schwanken bei den beschriebenen Tests um etwa den Faktor 10, bedingt durch die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten. Sie waren generell möglichst gering bemessen, weil hohe Konzentrationen an markiertem Antigen eine Verringerung der Empfindlichkeit eines Radioimmuntests zur Folge haben (vgl. WEILER, 1977). Die in die Tests eingesetzte Gesamtradioaktivität betrug jedoch stets 5000-10000 cpm, damit bei einer Zählzeit von zwei Minuten Zählraten erreicht werden konnten, deren Fehler nicht größer als 4 % war.

Alle sechs Radioimmuntests besitzen eine sehr hohe Empfindlichkeit. Sie ermöglichen den Nachweis von fmol-Mengen der Alkaloide; damit ist eine wesentliche Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen geschaffen. Es ist möglich, Material, das nur Spuren der Substanzen enthält, zu untersuchen oder die Alkaloidgehalte kleinster Probenmengen zuverlässig zu bestimmen. Ein Beispiel soll dies verdeutlichen:

In einem 10 ml-Extrakt einer Pflanzen- oder Zellkultur-Probe, deren Trockengewicht 1 mg beträgt, kann ein Thebain-Gehalt von $1 \times 10^{-3} \%$ noch nachgewiesen werden.

6. Untersuchungen zur Spezifität der Radioimmuntests

Der Einsatz eines Radioimmuntests bei Screeningversuchen, die die Bewältigung großer Probenmengen erfordern, setzt eine hohe Spezifität des Testsystems voraus. Nur wenn die Antikörper die zu messende Substanz auch in Anwesenheit ähnlicher Verbindungen selektiv erkennen und binden, kann eine Bestimmung aus ungereinigten Rohextrakten durchgeführt und auf zeitraubende Trenn- und Reinigungsschritte verzichtet werden. Die Bestimmung der Spezifität der Antikörper war deshalb einer der wichtigsten Schritte bei der Entwicklung der in dieser Arbeit beschriebenen Radioimmuntests.

6.1. Bestimmung von Kreuzreaktionen

Der erste Schritt zur Untersuchung der Spezifität eines Radioimmuntests besteht stets darin, das Bindungsverhalten der Antikörper gegenüber Substanzen zu bestimmen, die dem Antigen strukturell ähnlich sind. Die Ermittlung dieser sogenannten Kreuzreaktion läßt häufig Rückschlüsse darauf zu, welche Strukturen des Antigenmoleküls vom Antikörper erkannt und gebunden werden.

Zur quantitativen Abschätzung der Kreuzreaktion einer Substanz wird die Menge der Substanz bestimmt, die 50 % des markierten Antigens aus dem Antigen-Antikörper-Komplex verdrängen kann (die also $B/B_0 = 50 \%$ ergibt) und mit der Menge des Standard-Antigens verglichen, die ebenfalls einem B/B_0 -Wert von 50 % entspricht. Die prozentuale Kreuzreaktion ergibt sich dann nach folgender Formel (ABRAHAM, 1975):

$$KR (\%) = \frac{\text{Standard-Antigen-Menge bei } B/B_0 = 50 \%}{\text{Testsubstanz-Menge bei } B/B_0 = 50 \%}} \times 100$$

Um Kreuzreaktionen von Verbindungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten vergleichen zu können, werden die Werte in der Regel auf molarer Basis berechnet.

Nach dieser Methode wurden die Kreuzreaktionen von insgesamt 56 Isochinolinalkaloiden oder deren biosynthetischen Vorstufen in allen sechs Radioimmuntests ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt; die Strukturen der untersuchten Alkaloide gibt Abbildung 30 wieder.

Für die Kreuzreaktionen der getesteten Substanzen mit den (S)- und (R)-Retikulin-Antikörpern ergibt sich nun das folgende Bild:

1. Die Antikörper erkennen sehr spezifisch die Stereo-konfiguration am C-Atom 1. Damit ist also eine jeweils selektive Erfassung der beiden Retikuline ermöglicht. Erst wenn ein Enantiomer in mehr als 1000fach höherer Konzentration

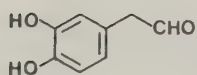
Ifd. Nr.	Substanz	(S)-Re- tikulin	Antikörper gegen			Codein	Morphin
			(R)-Re- tikulin	Salu- taridin	Thebain		
I	1. biosynthetische Vorstufen						
II	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd	0	0	0	0	0	0
III	Dopamin	0	0	0	0	0	0
IV	3-O-Methyldopamin	0	0	0	0	0	0
	4-O-Methyldopamin	0	0	0	0	0	0
V	2. 1-Benzylisochinoline						
VI	(S)-Norlaudanosolin	0	0	0	0	0	0
VII	(R)-Norlaudanosolin	0	0	0	0	0	0
VIII	(R,S)-6-O-Methylnorlaudanosolin	0	0	0	0	0	0
IX	(R,S)-7-O-Methylnorlaudanosolin	0	0	0	0	0	0
X	(R,S)-5'-O-Methylnorlaudanosolin	0	0	0	0	0	0
	(R,S)-4'-O-Methylnorlaudanosolin	0,8	0	0	0	0	0
XI	(R,S)-Laudanosolin	0	0	0	0	0	0
XII	(S)-Norretikulin	5,0	0,4	0	0	0	0
XIII	(R)-Norretikulin	0	35	0	0	0	0
XIV	(S)-Norretikulin-N-β-Propionsäure	59	0	0	0	0	0
XV	(R)-Norretikulin-N-β-Propionsäure	100	63	0	0	0	0
XVI	(S)-Retikulin	100	0	0	0	0	0
XVII	(R)-Retikulin	0	100	0	0	0	0
XVIII	(R,S)-Nororientalin	0	2,4	0	0	0	0
XIX	(R,S)-Orientalin	0	7,4	0	0	0	0
XX	(S)-Norprotosinomenin	0	0	0	0	0	0
XXI	(R)-Norprotosinomenin	0	0	0	0	0	0
XXII	(S)-Protosinomenin	0,1	0,6	0	0	0	0
XXIII	(R)-Protosinomenin	0	0	0	0	0	0
XXIV	(R,S)-Norisoorientalin	0	0	0	0	0	0
XXV	(R,S)-Isoorientalin	0	0	0	0	0	0
XXVI	(R,S)-Laudanidin	0	0,7	0	0	0	0
XXVII	(R,S)-Tetrahydropapaverin	0	0	0	0	0	0
XXVIII	(R,S)-Laudanosin	0	0	0	0	0	0
XXIX	(S)-Cocclaurin	0	0	0	0	0	0
XXX	(R)-Cocclaurin	0	4,3	0	0	0	0

I fd. Nr.	Substanz	Antikörper gegen				
		(S)-Re- tikulin	(R)-Re- tikulin	Salu- taridin	Thebain	Codein
XXXI	Dehydronorretikulin	0	0,1	0	0,2	0
XXXII	Dehydronorretikulin	0,3	0,1	0	0	0,2
XXXIII	Papaverin	0	0	0	0	0
3. Protuberberine						
XXXIV	(S)-Scoulerin	0	0	0	0	0
XXXV	(R,S)-Tetrahydrocolumbamin	0	0	0	0	0
XXXVI	(R,S)-Tetrahydropalmatin	0	0	0	0	0
XXXVII	Jatrorrhizin	0	0	0	0	0
XXXVIII	Palmatin	0	0	0	0	0
XXXIX	Berberin	0	0	0	0	0
4. Morphinane						
XL	Salutaridin	0	0	100	0	0
XLI	Salutaridinol I	0	0	424	0	0
XLII	Salutaridinol II	0	0	171	0,2	0
XLIII	Northebain	0	0	0,1	50	0
XLIV	Thebain	0	0	0,3	100	0
XLV	Oripavin	0	0	0	0,3	0
XLVI	Codeinon	0	0	0,1	0,2	0,4
XLVII	Norcodein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40
XLVIII	Norcodein-N-β-Propionsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100
IL	Codein	0	0	0	0	100
L	Normorphin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2
LI	Morphin	0	0	0	0	0,4
5. Aporphine						
LII	Glucin	0	0	0	0	0
LIII	Magnoflorin	0	0	0	0	0
LIV	Isothebain	0	0	0	0	0

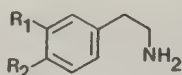
Lfd. Nr.	Substanz	(S)-Re- tikulin	(R)-Re- tikulin	Antikörper gegen			
				Salu- taridin	Thebain	Codein	Morphin
6.	Phthalid-Isochinoline						
LV	Narcotin	0	0	0	0	0	0
LVI	Narcein	0	0	0	0	0	0

Tab. 8: Kreuzreaktionen der (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin-, Thebain-, Codein- und Morphin-Antikörper, berechnet in % auf molarer Basis. Kreuzreaktionen unter 0,1 % wurden mit 0 bezeichnet. Die Strukturen der hier aufgeführten Substanzen sind in Abb. 30 dargestellt.

1. Biosynthetische Vorstufen



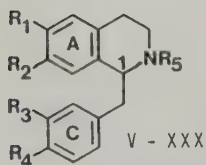
I



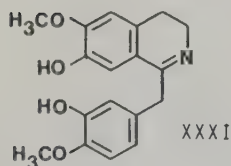
II-IV

	R ₁	R ₂
II	-OH	-OH
III	-OCH ₃	-OH
IV	-OH	-OCH ₃

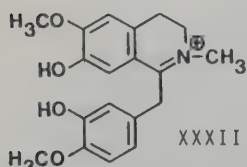
2. 1-Benzylisochinoline



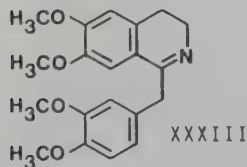
V - XXX



XXXI



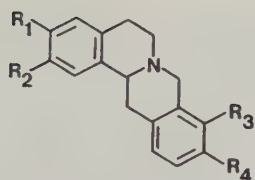
XXXII



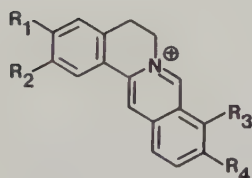
XXXIII

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
V = VI	-OH	-OH	-OH	-OH	-H
VII	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-H
VIII	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H
IX	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-H
X	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H
XI	-OH	-OH	-OH	-OH	-CH ₃
XII = XIII	-OCH ₃	-OH	-OH	-OCH ₃	-H
XIV = XV	-OCH ₃	-OH	-OH	-OCH ₃	-C ₂ H ₄ COOH
XVI = XVII	-OCH ₃	-OH	-OH	-OCH ₃	-CH ₃
XVIII	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H
XIX	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-CH ₃
XX = XXI	-OH	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H
XXII = XXIII	-OH	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-CH ₃
XXIV	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-H
XXV	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-CH ₃
XXVI	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-CH ₃
XXVII	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
XXVIII	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃
XXIX = XXX	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-H

3. Protoberberine



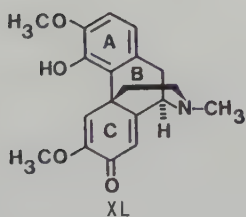
XXXIV - XXXVI



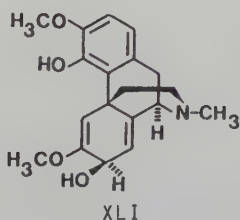
XXXVII - XXXIX

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
XXXIV	-OCH ₃	-OH	-OH	-OCH ₃
XXXV	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃
XXXVI	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
XXXVII	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
XXXVIII	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃
XXXIX		-OCH ₂ -	-OCH ₃	-OCH ₃

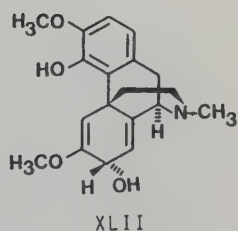
4. Morphinane



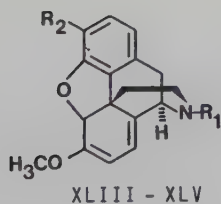
XL



XLI

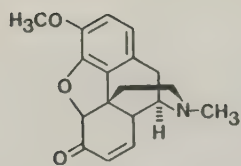


XLII

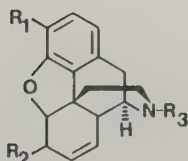


XLIII - XLV

	R ₁	R ₂
XLIII	-H	-OCH ₃
XLIV	-CH ₃	-OCH ₃
XLV	-CH ₃	-OH



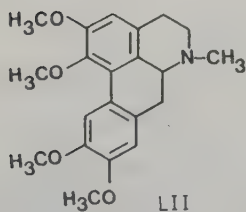
XLVI



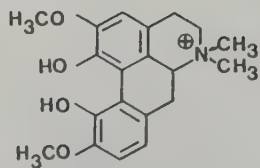
XLVII - LI

	R ₁	R ₂	R ₃
XLVII	-OCH ₃	-OH	-H
XLVIII	-OCH ₃	-OH	-C ₂ H ₄ COOH
IL	-OCH ₃	-OH	-CH ₃
L	-OH	-OH	-H
LI	-OH	-OH	-CH ₃

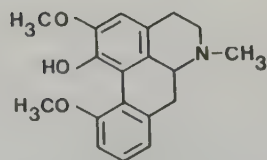
5. Aporphine



LII

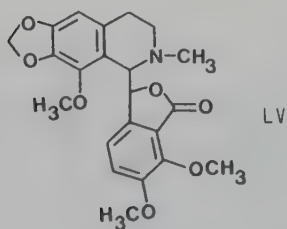


LIII

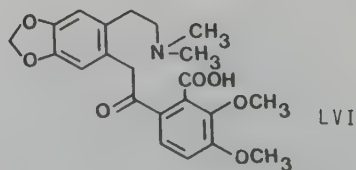


LIV

6. Phthalid-Isochinoline



LV



LVI

vorliegt, kann es die Quantifizierung des anderen Stereoisomeren verfälschen. Dies ist in Abbildung 31 veranschaulicht, in der die Standardkurven für jeweils die beiden Enantiomere im (S)- bzw. (R)-Retikulin-RIA dargestellt sind.

2. Die Propionsäure-Derivate, die bei der Konjugatsynthese verwendet wurden, besitzen eine hohe Kreuzreaktivität. Sie werden von den Antikörpern einerseits aufgrund der Strukturmerkmale erkannt und gebunden, in denen sie mit Retikulin übereinstimmen; andererseits kann eine Bindung an die Antikörper über den Propionsäure-Liganden des Stickstoffs erfolgen. Antikörper, die diesen Liganden erkennen, spielen für die Bindung jedoch eine untergeordnete Rolle. Sie müßten nämlich den Propionsäure-Rest spezifischer erkennen als die Methylgruppe des Retikulins, da er im Konjugat, das zur Erzeugung der Antikörper eingesetzt wurde, auftrat; dies würde wiederum bedeuten, daß die Kreuzreaktion größer als 100 % wäre.

Die Kreuzreaktivitäten der Propionsäure-Derivate demonstrieren nochmals die Stereospezifität der Antikörper; auch hier wird das Derivat mit der jeweils "falschen" Stereokonfiguration nicht vom Antikörper erkannt.

3. Eine signifikante Kreuzreaktion wurde für Norretikulin bestimmt, sofern es in seiner Konfiguration am C-Atom 1 mit dem jeweiligen Retikulin-Antigen übereinstimmt. Diese Kreuzreaktivität kann damit erklärt werden, daß sich die Verbindung vom Retikulin nur am Stickstoff unterscheidet. Dies ist der Teil des Moleküls, der vom Antikörper nicht

Abb. 30: Strukturen der Isochinolin-Alkaloide und biosynthetischen Vorstufen, deren Kreuzreaktionen in den Radioimmuntests zur Bestimmung von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin ermittelt wurden. Die Namen der Substanzen und ihre Kreuzreaktivitäten können Tab. 8 entnommen werden.

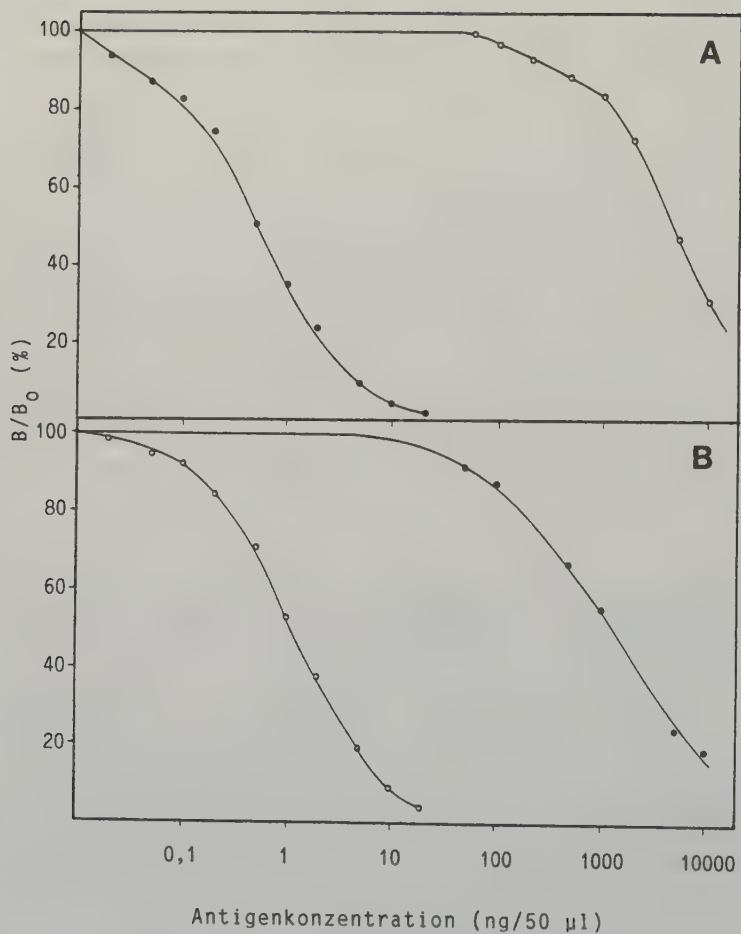


Abb. 31: Standardkurven von (S)-Retikulin (●) und (R)-Retikulin (○) in Radioimmunttests unter Verwendung von A. (S)-(NC³H₃)-Retikulin als markiertem Antigen sowie (S)-Retikulin-Antiserum und B. (R)-(NC³H₃)-Retikulin als markiertem Antigen sowie (R)-Retikulin-Antiserum. Aus den Kurven wurden die Kreuzreaktionen der beiden Retikulin-Enantiomeren im (S)- bzw. (R)-Retikulin-RIA ermittelt.

spezifisch erkannt werden kann, da er auch im Immunogen verändert war.

4. Sämtliche Tetrahydrobenzylisochinoline, die sich in ihrem Methylierungsmuster vom Retikulin unterscheiden, weisen keine oder nur niedrige Kreuzreaktionen auf. Dies zeigt, daß die Antikörper sehr spezifisch die Strukturen der aromatischen Ringe A und C (Abb. 30) erkennen. Damit ist eine selektive Bestimmung der Retikuline, auch in Anwesenheit anderer Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloide, gewährleistet.

Gegenüber dem (S)-Retikulin-Antiserum besitzen nur zwei Verbindungen eine meßbare, aber geringe Kreuzreaktivität: (R,S)-4'-O-Methylnorlaudanolin (0,8 %) und (S)-Protosinomenin (0,1 %). Beide Alkaloide sind in ihrem C-Ring mit Retikulin identisch. Dies legt nahe, daß die gegen das (S)-Isomer gerichteten Antikörper die Strukturen des C-Ringes spezifischer erkennen als die des A-Ringes. Das geringe Ausmaß der Kreuzreaktion demonstriert jedoch andererseits, daß auch der A-Ring wesentlich in eine Bindung an den Antikörper einbezogen wird. Diese Vermutung wird unterstützt durch den Befund, daß Laudanidin, das ebenfalls im C-Ring mit Retikulin übereinstimmt, nicht kreuzreagiert.

Gegenüber dem (R)-Retikulin-Serum weisen von den untersuchten Tetrahydrobenzylisochinolin (R,S)-Orientalin (7,4 %) und (R,S)-Nororientalin (2,4 %) sowie (R)-Coclaurin (4,3 %) die höchsten Kreuzreaktionen auf. Die drei Alkaloide besitzen in ihrem A-Ring ein mit Retikulin übereinstimmendes Methylierungsmuster; der (R)-Retikulin-Antikörper erfaßt demnach die Strukturen des A-Ringes selektiver als die des C-Ringes.

5. Die Benzylisochinoline Dehydronorretikulin und Dehydroretikulin zeigen fast keine Kreuzreaktion. Dies entspricht den Erwartungen, da sie gegenüber Retikulin am C-Atom 1, dessen Struktur die Antikörper spezifisch erkennen, verändert

sind.

6. Alle untersuchten Alkaloide, die strukturell nicht den Benzylisochinolininen zugeordnet werden können (Protoberberine, Morphinane, Aporphine, Phtalidisochinolone) besitzen keine meßbare Kreuzreaktivität im (S)- bzw. (R)-Retikulin-RIA.

Im Salutaridin-Radioimmunistest weisen die beiden epimeren Alkohole Salutaridinol I und II hohe Kreuzreaktionen (424 bzw. 171 %) auf. Dies läßt sich auf zwei Ursachen zurückführen:

1. Die Antikörper können die Struktur des Salutaridins am C-Atom 7 nicht spezifisch erkennen, da das Immunogen ebenfalls an diesem C-Atom verändert war (vgl. Abb. 13).

2. Als markiertes Antigen fand (7-³H)-Salutaridinol Verwendung, das von unmarkiertem Salutaridinol sicherlich besser aus dem Antigen-Antikörper-Komplex verdrängt werden kann als von Salutaridin. Da als markiertes Antigen Salutaridinol I eingesetzt wurde, zeigt dieses Epimer eine höhere Kreuzreaktivität als Salutaridinol II.

Von allen weiteren untersuchten Alkaloiden besitzt nur Thebain, das in der Biosynthese des Morphins aus Salutaridinol I entsteht (vgl. Abb. 2) eine meßbare, aber sehr geringe Kreuzreaktion (0,3 %) im Salutaridin-RIA.

Die gegen Thebain gerichteten Antiseren erwiesen sich ebenfalls als hochspezifisch. Erwähnenswert ist hier die sehr geringe Kreuzreaktion von Oripavin (0,3 %), das sich durch Demethylierung am C-Atom 3 von Thebain ableiten läßt (vgl. Abb. 3). Dieser Befund zeigt, daß die Antikörper selektiv den A-Ring des Morphinans erkennen können. Schließlich weist Northebain eine Kreuzreaktion von 50 % auf. Die Verbindung unterscheidet sich von Thebain nur in der Derivatisierung des Stickstoffatoms. Dieser Teil des Moleküls war jedoch auch im Immunogen, dem Northebain-N- β -Propionsäure-

BSA-Konjugat verändert; er kann deshalb vom Antikörper nicht spezifisch erkannt werden.

Mit den Antiseren, die in den Codein- und Morphin-Radioimmuntests verwendet wurden, ist jeweils eine selektive Erfassung der beiden Substanzen gewährleistet. Dadurch, daß im Konjugat die Alkaloide über ihr Stickstoffatom derivatisiert worden sind, wurden die C-Atome 3 und 6 so exponiert, daß die gebildeten Antikörper die Strukturen an diesen C-Atomen hoch spezifisch erkennen. Dies läßt sich mit folgenden Befunden belegen:

1. Codein besitzt im Morphin-Test keine meßbare Kreuzreaktion.

2. Morphin weist im Codein-RIA eine Kreuzreaktivität von nur 0,4 % auf, d. h. es führt erst zu einer Verfälschung der Codein-Messung, wenn es in mehr als 200fach höheren Mengen als Codein in Extrakten vorliegt.

3. Für Codeinon, das sich in 6-Position vom Codein unterscheidet, wurde eine Kreuzreaktion von nur 0,4 % mit dem Codein-Antiserum ermittelt.

4. Oripavin zeigt eine relativ hohe Kreuzreaktion von 6,2 % im Morphin-RIA. Es wird vom Antikörper gebunden, da es im A-Ring eine mit Morphin übereinstimmende Struktur besitzt.

Die hohe Kreuzreaktion der N-Nor-Derivate von Codein und Morphin läßt sich, wie bei den Kreuzreaktionen mit den Retikulin- und Thebain-Antiseren ausgeführt, mit der Benutzung von Norcodein- bzw. Normorphin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugaten zur Immunisierung erklären.

6.2. Verteilung von immunreaktivem Material in dem HPLC-Eluat eines Papaver somniferum-Pflanzenextraktes

Mit der Bestimmung der Kreuzreaktionen konnte die Interferenz einer Reihe von Isochinolinalkaloiden in den sechs Radioimmuntests untersucht werden. Dennoch existiert im Pflanzenmaterial eine große Anzahl weiterer Verbindungen, die den Testsubstanzen strukturell ähnlich sind und deshalb mit dem Antikörper reagieren können. Um den dadurch bedingten Fehler zu erfassen oder im umgekehrten Fall die Spezifität der in dieser Arbeit vorgestellten Testsysteme weiter zu untermauern, wurde ein Rohextrakt einer Papaver somniferum-Pflanze mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und das fraktionierte Eluat mit den sechs Radioimmuntests untersucht, um die Verteilung des immunreaktiven Materials zu ermitteln. Im einzelnen wurde dieses Experiment wie folgt durchgeführt:

Eine 90 Tage alte Papaver somniferum-Pflanze (FG= 106 g) wurde zerkleinert und mit 1000 ml heißem 80 %-igem Methanol 12 Stunden bei 60°C im Wasserbad extrahiert. Nach Abtrennung des Pflanzengewebes wurde die methanolische, stark dunkelgrün gefärbte Lösung unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt, in 100 ml H₂O wieder aufgenommen, mit 1 N HCl leicht angesäuert (pH 4-5) und extensiv mit Petroläther extrahiert, bis die wässrige Phase entfärbt war. Die H₂O-Lösung wurde anschließend auf eine XAD-Adsorberharz-Säule (2 cm ø x 15 cm Höhe) gegeben, von der die Alkaloide mit Methanol eluiert werden konnten. Das methanolische Eluat (Volumen: 2 ml) stellte den für die HPLC-Auftrennung vorgesehenen Rohextrakt dar. In Vorversuchen war ermittelt worden, daß bei dieser Vorreinigung des Extraktes kein Verlust des immunreaktiven Materials auftritt.

Die HPLC-Auftrennung eines 50 µl-Aliquots des Rohextraktes erfolgte unter den in Abschnitt II.6. angegebenen Bedingungen. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen (1 Fraktion/

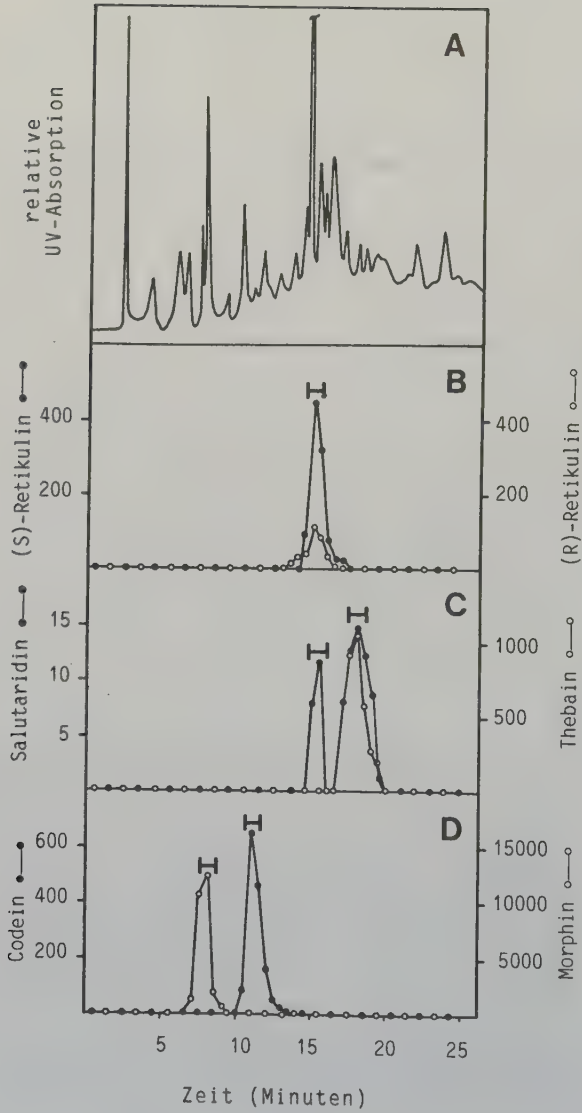
0,5 min.), und die Fraktionen wurden mit jedem der sechs Radioimmuntests untersucht. Die Verteilung der Immunreaktivitäten in Abhängigkeit von der Retentionszeit zeigt Abbildung 32.

Um die exakten Retentionszeiten der sechs Opiumalkaloide zu ermitteln, mußten jeweils authentische Proben der Substanzen (10 µg) unter den gleichen Bedingungen wie der Rohextrakt chromatographiert und fraktioniert sowie das Auftreten der Alkaloide im Eluat radioimmunologisch bestimmt werden.

Es zeigte sich, daß mit den Tests für (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Thebain, Codein und Morphin nur dort immunreaktives Material gefunden wurde, wo jeweils die authentischen Alkaloide zu erwarten waren (vgl. Abb. 32 B,C,D). In diesen Testsystemen konnte demnach keinerlei Interferenz von anderen, im Rohextrakt vorhandenen, Alkaloiden festgestellt werden. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis auf die hohe Spezifität der RIA's. Es ist vor allem deshalb bemerkenswert, als die Trennung der in dem Rohextrakt vorhandenen Substanzen mit dem HPLC-System mit hoher Auflösung erfolgt. Dies ist aus dem UV-Profil der chromatographischen

Abb. 32: HPLC-Auftrennung eines Rohextraktes einer Papaver somniferum-Pflanze. Chromatographische Bedingungen: vgl. Abschnitt II.6. Teil A zeigt das UV-Profil, die Teile B-D zeigen, in Abhängigkeit von der Retentionszeit, die Verteilungen der immunreaktiven Substanzen, die mit den Radioimmuntests für (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin nachgewiesen wurden. Retentionszeiten der Referenzen: 15,5 min. ((S)- und (R)-Retikulin)⁺, 15,5 min. (Salutaridin)⁺, 12,0 min. (Salutaridinol I), 18,5 min. (Thebain)⁺, 8,0 min. (Codein)⁺, 11,5 min. (Morphin)⁺; + = durch Balken gekennzeichnet.

Alle Alkaloid-Gehalte sind in ng/Fraktion ($\approx$ 0,75 ml) angegeben.



Auftrennung ersichtlich (Abb. 32 A). In diesem Zusammenhang sollte schließlich noch erwähnt werden, daß die Verbindungen, die über ihre UV-Absorption erfaßt werden können, in sehr viel höheren Konzentrationen vorliegen als die Alkaloide, die radioimmunologisch gemessen wurden und daß selbst diese hohen Konzentrationen der Substanzen die Ergebnisse der Tests nicht verfälschen.

Aus Abbildung 32 D läßt sich ablesen, daß Morphin, selbst wenn es in einem mehr als 20fachen Überschuß zum Codein vorliegt, die Codein-Bestimmungen nicht stört. Dieser Befund unterstützt das Ergebnis der Kreuzreaktions-Untersuchungen (vgl. III.6.1.), das mit der Reinsubstanz Morphin erhalten wurde.

Eine zweigipflige Verteilung der Immunreaktivität zeigt sich nur bei der Messung mit dem Salutaridin-RIA (Abb. 32 C). Das nicht mit Salutaridin korrespondierende Material besitzt eine mit Thebain übereinstimmende Retentionszeit, so daß eine Interferenz des Thebains in den Salutaridin-Bestimmungen nahegelegt wird. Dies wäre dann jedoch nicht auf eine geringe Spezifität der Salutaridin-Antikörper zurückzuführen, sondern darauf, daß Thebain in etwa 100fach höherer Menge in Papaver somniferum vorliegt. Bei diesen Konzentrationsverhältnissen würde eine Kreuzreaktion des Thebains im Salutaridin-Radioimmuntest von 0,5-1,0 % ausreichen, um die Meßergebnisse zu beeinflussen. Die in Tabelle 8 angegebene Kreuzreaktion des Thebains von 0,3 % weicht von diesem Wert nur geringfügig ab.

Um zu bestätigen, daß das nicht mit Salutaridin übereinstimmende immunreaktive Material Thebain darstellt, wurden die fraglichen Fraktionen vereinigt und einer Dünnschichtchromatographie unterworfen (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 7; R_f (Thebain) = 0,68, R_f (Salutaridin) = 0,32). Das Chromatogramm wurde in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, die jeweils mit 1 ml Methanol eluiert wurden. Eine Messung

des Eluats mit dem Salutaridin-RIA ergab, daß die immunreaktiven Banden erneut einen mit Thebain übereinstimmenden Rf-Wert besaßen. Das gleiche Ergebnis liefert eine weitere dünn-schichtchromatographische Auftrennung (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 9; R_f (Thebain) = 0,80, R_f (Salutaridin) = 0,71) der aktiven Fraktionen. Diese Befunde legen nahe, daß es sich bei der Substanz des Papaver somniferum-Rohextraktes, die im Salutaridin-Radioimmuntest interferiert, um Thebain handelt. Sie schränken damit die Aussagekraft der radioimmunologischen Salutaridin-Bestimmung ein, sofern ein hoher - mehr als 100-facher - Überschuß von Thebain vorliegt.

Trotzdem läßt sich zusammenfassend feststellen, daß die Untersuchung des HPLC-Eluats des Schlafmohn-Extraktes mit Hilfe der sechs Radioimmuntests erneut die hohe Spezifität der verwendeten Antikörper unter Beweis stellen konnte. Sie erlaubt - mit der genannten Einschränkung - eine parallele Quantifizierung aller Alkaloide mit dem gleichen Probenmaterial, wie es bei Screening-Versuchen wünschenswert wäre.

6.3. Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurven.

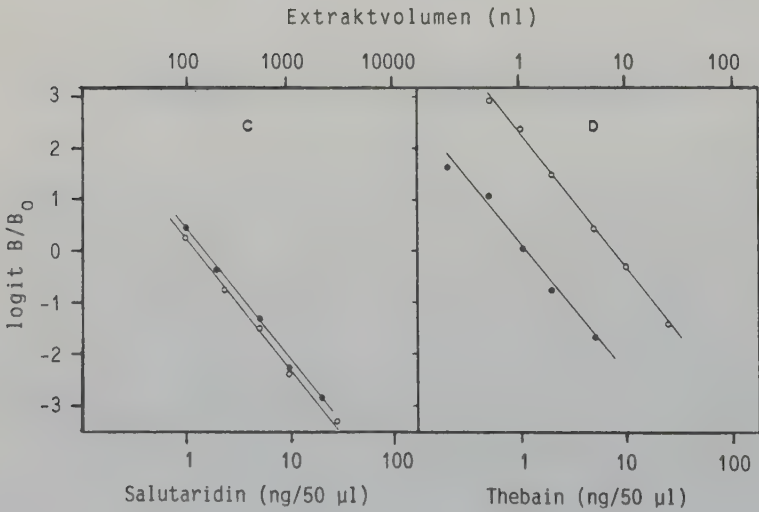
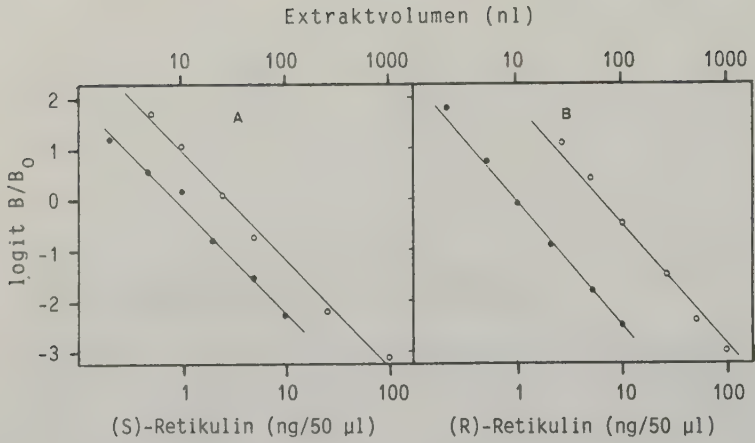
Wenn in einem Rohextrakt außer der zu messenden Substanz keine weiteren Verbindungen vorliegen, die mit dem Antikörper reagieren können, so muß eine Verdünnungskurve dieses Extraktes (B/B_0 gegen eingesetztes Extraktvolumen) parallel zur Standardkurve (B/B_0 gegen Antigenmenge) verlaufen. Der Test auf Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurve ist also ein weiterer Hinweis auf die Spezifität eines Radioimmuntests; er kann allerdings nur durch grobe Störungen verfälscht werden (CEKAN, 1975). Die Parallelität der zwei Kurven kann dadurch anschaulich gemacht werden, daß jeweils die nach der logit-Transformation erhaltenen Geraden aufgetragen und ihre Steigungen verglichen werden.

Mit dem Rohextrakt einer Papaver somniferum-Pflanze, der wie unter III.6.2. angegeben hergestellt worden war, wurden Extraktverdünnungskurven für die sechs Radioimmuntests erstellt. Sie sind in Abbildung 33 zusammen mit der jeweiligen Standardkurve aufgezeichnet; ihre Steigungen faßt Tabelle 9 zusammen. Der Versuch zeigt eine gute Übereinstimmung der

Standard-Antigen	Steigung der Standardkurve	Steigung der Extraktverdünnungskurve
(S)-Retikulin	- 2,08	- 2,17
(R)-Retikulin	- 2,41	- 2,42
Salutaridin	- 2,57	- 2,54
Thebain	- 2,63	- 2,59
Codein	- 2,43	- 2,34
Morphin	- 3,05	- 3,08

Tab. 9: Steigungen der linearisierten Standard- und Extraktverdünnungskurven der sechs Radioimmuntests. Die dazugehörigen Geraden zeigt Abbildung 33.

Steigungsfaktoren und demonstriert damit erneut die Spezifität der verwendeten Antiseren. Seine Aussagekraft muß jedoch eingeschränkt werden, da die Interferenz des Thebains im Salutaridin-RIA, die aufgrund der HPLC-Untersuchungen (vgl. III.6.2.) erkannt wurde, sich in der Steigung der Verdünnungskurve des Salutaridin-Tests nicht niederschlägt. Mit dem Test auf Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurve können demnach nicht alle störenden Verbindungen erfaßt werden.



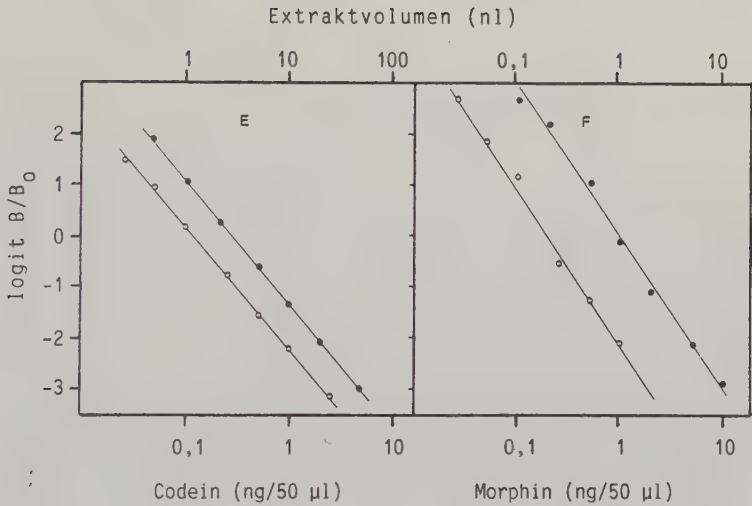


Abb. 33: Linearisierte Darstellung von Standard- (•) und Extraktverdünnungskurven (◦) des (S)-Retikulin- (A), (R)-Retikulin- (B), Salutaridin- (C), Thebain- (D), Codein- (E) und Morphin-Radioimmuntests (F). Die Steigungen der Kurven können der Tabelle 9 entnommen werden.

7. Untersuchungen zum Vorkommen der Opiumalkaloide
in differenzierten Pflanzen

7.1. Bestimmung von Opiumalkaloiden in Herbarmaterial
von Papaver-Arten

FEDDE publizierte 1909 erstmals eine Monographie der Gattung Papaver, in der er die 99 Arten umfassende Gattung in 9 Sektionen unterteilte. Diese von ihm vorgenommene taxonomische Kategorisierung und die Zuordnung der einzelnen Arten zu den verschiedenen Sektionen ist allerdings bis heute kontrovers (vgl. KOHN und PFEIFER, 1963). Eine neuere Bibliographie der Gattung Papaver aus dem Jahre 1973 führt beispielsweise eine weitaus größere Anzahl verschiedener Arten auf, nämlich 171 (AGRICULTURE RESEARCH SERVICE, 1973). Zur Klärung der systematischen Gliederung der Gattung Papaver werden, neben morphologischen und cytologischen Kriterien, in immer stärkerem Maße auch die Inhaltsstoffe der Pflanzen, insbesondere die Alkaloide, herangezogen (KOHN und PFEIFER, 1963; STERMITZ, 1968). Solche Untersuchungen der Alkaloid-Zusammensetzung von Papaver-Pflanzen können darüber hinaus zur Entdeckung neuer Quellen für die Gewinnung von pharmazeutisch nutzbaren Verbindungen führen.

Bei der Analyse von Papaver-Material, das einer oder nah verwandten Arten zugeordnet werden konnte, stellte sich häufig heraus, daß die Alkaloid-Zusammensetzung in großem Maße von der Herkunft der Pflanzen abhängig ist und daß innerhalb einer Art verschiedene sogenannte "chemische Rassen" auftreten können (KOHN und PFEIFER, 1963; PHILLIPSON et al., 1981b). Das bedeutet, daß sowohl bei chemotaxonomischen Untersuchungen als auch bei der Suche nach Material, das zur Gewinnung eines bestimmten Alkaloids herangezogen werden soll, stets Pflanzen-Arten verschiedener Herkünfte analysiert werden müssen. Dies scheitert jedoch häufig daran, daß frisches Pflanzenmaterial verschiedenen Ursprungs nicht zur Verfügung

steht. PHILLIPSON (1982) führte deshalb solche vergleichenden Untersuchungen von Papaver-Arten mit Hilfe von Herbarmaterial durch. Zur Identifizierung der Alkaloide benutzte er nach dünnstschichtchromatographischer Auftrennung der Herbarextrakte spezifische Farbreaktionen sowie die Massenspektroskopie. Erstmals konnten WEILER et al. (1980) zeigen, daß zur Analyse herbarisierter Pflanzen ein radioimmunologisches Testverfahren geeignet ist. Die Autoren untersuchten das Auftreten des Alkaloids Solasodin in 250 verschiedenen Solanum-Arten unter Benutzung von Herbarmaterial. Die in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntests sollten eingesetzt werden, um in Herbarmaterial aller verfügbaren Papaver-Arten das Auftreten der sechs Opiumalkaloide zu untersuchen. Auf diese Weise sollte erstmals ein taxonomischer Überblick über das Auftreten von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin in der Gattung Papaver erhalten werden.

Das analysierte Material, das den unter II.1.2. angegebenen Herbarien entstammte, wurde extrahiert und radioimmunologisch analysiert (vgl. II.1.3.). Das Ergebnis dieser Untersuchung faßt Tabelle 10 zusammen. Die in der Tabelle angegebene Bezeichnung der Pflanzen erfolgte entsprechend der Angaben auf den Herbarbögen.

Unter den verwendeten Bedingungen betrugen die Nachweisgrenzen $2 \times 10^{-5} \%$ (S)-Retikulin, $7 \times 10^{-5} \%$ (R)-Retikulin, $1 \times 10^{-4} \%$ Salutaridin, $5 \times 10^{-5} \%$ Thebain und $3 \times 10^{-5} \%$ Codein bzw. Morphin, jeweils bezogen auf das Trockengewicht.

Aus der Tabelle geht hervor, daß alle Alkaloide in den Herbarproben noch nachweisbar sind. Die älteste Papaver somniferum-Pflanze, die analysiert wurde, war über 200 Jahre alt und stammte aus dem Geburtsjahr des Entdeckers des Morphins, F.W. Sertürner. Selbst in diesem Exemplar konnten noch sämtliche Alkaloide nachgewiesen werden, wenn auch in geringeren Konzentrationen als in frischem Pflanzenmaterial.

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (R)-Ret. Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. acrochaetum</i> Bornm.	Armenien	1957/M	28	42	330	1,4	0 0,2
	Kurdistan	1957/M	0,2	0,2	0,5	0	0 0
	Kurdistan	1957/M	5,2	0,4	0	0	0 0
<i>P. aculeatum</i> Thunb.	Australien	1861/M	2,9	2,0	1,4	0	0 0,3
	Südafrika	1955/M	1,8	0,8	3,5	0	0 0
	Südafrika	1963/M	2,2	0,5	0	0	0 0
<i>P. alboroseum</i> Hult.	München (Leningrad)	1983	1,0	0,1	0	0	0 0
<i>P. alpinum</i> L.	Österreich	1893/M	0,8	0,6	1,8	0	0 0
	Österreich	1957/M	0,4	0,5	3,5	0	0 0
	München (Nijmegen)	1983	0,2	1,3	2,8	0	0 0
	München (Regensburg)	1983	16	1,2	2,9	0	0 0
<i>P. amurense</i> Hort. ex Karrer	München (Leningrad)	1983	0,2	0,9	1,0	0	0 0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. angustifolium</i> A. Tolm.	Sibirien	1971/M	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>P. anjuicum</i> Tolm.	Sibirien	1975/M	1,0	0,1	0	0	0	0
	Sibirien	1976/M	0	0,3	0	0	0	0
<i>P. anomalum</i> Fedde	Ost-Asien	1975/M	0,4	0,3	0,4	0	0	0
<i>P. apulum</i> Ten.	Jugoslawien	1957/M	1,2	0	0	0	0	0
	München (Cambridge)	1983	1,1	0	0	0	0	0
	Italien	? /M	0,7	0	0	0	0	0
<i>P. arenarium</i> Bieb.	Irak	1956/M	0	0	0	0	0	0
	Kaukasus	1973/M	0	0	0	0	0	0
	Anatolien	? /M	0	0	0	0	0	0
<i>P. argemone</i> L.	Süddeutschland	1899/M	0	0	0	0	0	0
	Süddeutschland	1983/M	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)					
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. armeniacum</i> (L.) DC.	München (Leipzig)	1983	0	0,8	0,4	0	0	0
	München (Tübingen)	1983	0,6	0,1	0	0	0	0
	Kuh-Deena	1842/M	1,2	0,2	0,6	0	0	0
	Sharud-Bustam	1948/M	0,7	0,4	1,8	0	0	0
	Sharud-Bustam	1948/M	0,6	0,5	2,7	0	0	0
<i>P. atlanticum</i> (Ball)Coss.	München (Göteborg)	1983	4,6	0,8	38	6,3	0	0
	Marokko	1951/M	21	1,5	0,3	0	0	0,2
	Marokko	1951/M	3,5	1,5	0	0	0	0
	München	1983	5,1	0,4	0,4	0	0	0
	Italien	1904/M	2,8	0,3	0,8	0	0	0
<i>P. aurantiacum</i> Loisel	Frankreich	1955/M	0,6	1,5	1,2	0	0	0
	Frankreich	1970/M	0,6	0,6	0,7	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)				Morphin
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	
<i>P. belangeri</i> Boiss.	Türkei	1981/I	0	0	0,3	0,9	0
	Iran	? /G	0,1	0	0,3	0	0
<i>P. bipinnatum</i> C.A. Mey	?	1931/Lo	0,1	0	0	0	0
<i>P. bracteatum</i> Lindl.	Süddeutschland	1834/M	1,4	0	58	242	0,2
	München	1849/M	1,3	0,1	35	542	0,6
	Iran	1977/M	1,0	0,2	0,8	0	0
	München (Antwerpen)	1983	3,1	14	189	0,3	0
	München (Linz)	1983	0,4	0,1	0,2	0,2	0
<i>P. burseri</i> Crantz	München (Wuppertal)	1983	0,6	1,9	4,6	0	0
<i>P. californicum</i> A. Gray	Pazifische Küste	1907/M	0	0	0	0	0
	München (Izmir)	1983	0,8	0,3	0	0	0
<i>P. canescens</i> A. Tolm.	Sibirien	1972/M	0,3	0	0,8	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. carmeli</i> Feinbr.	Palästina	1956/Lo	0,1	0,2	0,4	0,5	0	0
	Palästina	1956/Lo	0,2	0,4	0,8	0,9	0	0
<i>P. caucasicum</i> Bieb.	Kaukasus	1838/M	3,2	2,4	389	8,3	0	0
	Süddeutschland	1847/M	3,2	2,6	253	26	0,1	0
	Süddeutschland	1867/M	6,8	3,0	26	0	0	0,1
	München (Genf)	1983	1,5	0,4	1,6	0	0	0
	München (Warschau)	1983	1,2	0,5	2,0	0	0	0,1
<i>P. chelidonii-</i> <i>folium</i> Boiss. & Buhse	Iran	1972/M	0	0	0	2,0	0	0
<i>P. clavatum</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	Türkei	1977/I	0,1	0	0	0	0	0
<i>P. commutatum</i> Fisch & C.A.Mey	Kaukasus	1973/M	0	0	0	0	0	0
	München (Hauniens)	1983	0,3	0,1	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbarisierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Thebain	Codein	Morphin
	München (München)	1983	4,3	0,1	0,6	0	0
	Armenien	? /M	0	0	0	0	0
P. coronata	Karpaten	1935/M	0,5	0,7	3,3	0	0
P. sancti-stephani Zapal.	Rumänien	1965/M	0,3	0,3	1,2	0	0
P. croceum Ledeb.	Kashmir	1955/M	0,2	0,2	0	0	0
	Kashmir	1959/M	1,5	0,3	0,5	0	0
	Afghanistan	1964/M	1,5	0,2	1,0	0	0
	München (Heidelberg)	1983	0,1	0,8	4,3	0	0
P. curviscapum Nabel.	Irak	1947/Lo	6,4	3,3	0,3	0	0
	Türkei	1966/Lo	1,9	9,7	0,4	0	0
	Türkei	1968/M	4,0	3,0	1,0	0	0
P. cylindricum Cullen	Irak	1960/Lo	1,4	4,2	4,1	45	0,1
							7,6

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	(R)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
	Türkei	? /Lo	23	8,0	49	687	0,9	11
P. dahlianum Nordh.	Spitzbergen	1882/M	0	0	0	0	0	0
	Spitzbergen	1922/M	0	0,2	0	0	0	0
	Spitzbergen	1975/M	0,4	2,6	0,2	0	0	0
P. decaisnei Hochst.	Iran	1948/M	0,5	0	0	0	0	0
	Afghanistan	1962/M	0	0	0	0	0	0
	Afghanistan	1962/M	0,8	0,4	0	0	0	0
P. degenii Mgf.	Italien	1965/M	3,0	0,7	48	0	0	0
	Italien	1965/M	2,8	0,6	55	0	0	0
	Süddeutschland	1937/M	0,5	0,5	0	0	0	0
P. dubium L.	Afghanistan	1963/M	0	0	0	0	0	0
	Süddeutschland	1975/M	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
P. ernesti- mayeri Mgf.	München (Göttingen)	1983	0,5	0	0	0	0	0
	Jugoslawien	1953/M	3,4	1,4	2,4	0	0	0
	Italien	1956/M	2,7	0,9	1,8	0	0	0
P. fauriei Fedde	München (München)	1983	0,1	0,1	0	0	0	0
	München (Heidelberg)	1983	0,5	1,2	1,4	0	0	0
P. fugax Poir.	Kurdistan	1841/M	0,7	0,3	0,2	0	0	0
	Türkei	1971/M	4,6	2,4	40	1,8	0	0
	Kaukasus	1975/M	3,7	8,6	24	0	0	0
P. glaucum Boiss. & Hausskn.	München (St. Gallen)	1983	0,9	1,3	13	0	0	0
	Kurdistan	1956/M	0,5	0	0	0	0	0
	München (München)	1983	0,1	0,1	0,4	0	0	0
P. gorgoneum Coutinho	Kapverden	1978/S	1,1	0,9	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
	Kapverden	1978/S.	0,7	0,7	0	0	0	0
	Kapverden	1980/S	1,9	1,3	0	0	0	0
	Kapverden	1980/S	0,8	0,9	0	0	0	0
	Kapverden	1982/S	1,8	1,0	0	0	0	0
	Kapverden	1982/S	2,5	1,3	0	0	0	0
	Kapverden	1982/S	0,8	0,6	0	0	0	0
	Kapverden	1982/S	1,0	0,6	0	0	0	0
	Sibirien	1973/M	0,2	0,2	0,4	0	0	0
P. gorodkovii Tojm. et Petrovsky								
P. gracile Boiss.	Türkei	1973/M	0,6	0,7	1,0	0	0	0
	München (Izmir)	1983	5,1	3,9	2,0	3,6	14	64
P. heldreichii Boiss.	Kleinasien	1917/M	3,3	0,5	31	0	0	0,1

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)					Morphin
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Salutaridin	Thebain	Codein	
P. hultenii Knaben	Alaska	1976/M	0,2	0,2	0,4	0	0	0
P. humile Fedde	München (Heidelberg)	1983	0	0	2,1	0	0	0
	München (Heidelberg)	1983	0	0	0	0	0	0
P. hybridum L.	Südastralien	1956/M	0,2	0	0	0	0	0
	München (Karlsruhe)	1983	0,5	0	0	0	0	0
	München (Marburg)	1983	1,7	0,2	0	0	0	0
P. involucreatum Pop.	Afghanistan	1965/M	0,1	0,1	0,2	0	0	0
	Afghanistan	1969/M	0	0,1	0	0	0	0
P. kernerii Hayek	Österreich	1912/M	1,2	0,5	1,8	0	0	0
	Österreich	1949/M	1,0	1,0	4,2	0	0	0
	Jugoslawien	1970/M	4,2	0,7	4,1	0	0	0
	München (Jena)	1983	10	1,4	1,3	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. lacerum</i> Pop.	Türkei	1967/I	0,3	0,2	0,2	0	0	0
	Türkei	1977/I	0,3	0,1	0,2	0	0	0
	Türkei	1981/I	0	0	0	0	0	0
<i>P. laevigatum</i> Bieb.	Türkei	1891/M	0	0	0	0	0	0
	Griechenland	1918/M	0,8	0	0	0	0	0
<i>P. lapponicum</i> (A.Toim.)Nordh.	Lappland	1843/M	0	0,2	0,7	0	0	0
	Sibirien	1946/M	0,1	0,1	0	0	0	0
	Sibirien	1968/M	0,1	0,1	0	0	0	0
<i>P. lasiothrix</i> Fedde	Türkei	1975/I	1,0	1,1	159	0,3	0	0
<i>P. lateritium</i> C. Koch	München (Haunten)	1983	1,3	0,2	0,3	0	0	0
	München (Nancy)	1983	0,5	0,3	0	0	0	0
<i>P. leiocarpum</i> Turcz.	?	? /Le	0,2	0,5	0,7	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)			
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain Codein Morphin
<i>P. litwinowii</i> Fedde ex Bornm.	Afghanistan	1970/M	0	0	0	0
	Afghanistan	? /M	0	0	0	0
	Afghanistan	? /M	0,5	0	0	0
<i>P. macounii</i> Greene	Kanada	1949/M	0	0,2	0	0
<i>P. macrostomum</i> Boiss. & Huet ex Boiss.	Anatolien	1896/M	0,2	0	0	0
	Irak	1957/M	0,1	0	0	0
	Kaukasus	1975/M	0	0	0	0
<i>P. maeoticum</i> Klokov ex Klokov & Wissjul.	?	1926/Le	0,3	0	0	0
	?	1965/Le	0,4	0,3	0	0
<i>P. mairei</i> Battand.	Algerien	1921/M	0,2	0,1	0	0
<i>P. malviflorum</i> Dum.	Algerien	1924/Lo	0,2	0,2	0,2	0,1
<i>P. microcarpum</i> DC.	?	? /M	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. nigrotrinctum</i> Fedde	Türkei	1965/Lo	0,9	0,2	0	0,2	0	0
	Griechenland	1968/Lo	0	0	0	0	0	0
	Griechenland	1970/Lo	0	0	0	0,1	0	0
<i>P. nudicaule</i> L.	Süddeutschland	1836/M	0,2	0,4	0	0	0	0
	Kansu, China	1915/M	0	0,1	0,3	0	0	0
	Hopei, China	1974/M	0,1	0,1	0,1	0	0	0
	München (Weihenstephan)	1983	0,2	0,1	0,9	0	0	0
<i>P. obtusifolium</i> Desf.	Algerien	1915/M	0,3	0,2	0	0	0	0
<i>P. oreophilum</i> Rupr.	München (Stuttgart)	1983	2,9	0,2	0	0	0	0
<i>P. orientale</i> L.	Süddeutschland	1863/M	3,5	0,4	27	37	0,2	0,1
	Kaukasus	1975/M	0,7	0,2	0,7	18	0	4,6
	Iran	1977/M	0,8	0,1	0,6	10	0	1,2

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	(R)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
	München (Budapest)	1983	1,6	0,7	76	0,1	0	0,1	
	München (Halle)	1983	4,0	2,6	55	1,3	0	0,2	
<i>P. paucifoliatum</i> (Trautv.) Fedde	Kaukasus	1975/M	1,5	0,1	0,4	6,6	0	1,7	
<i>P. paucistami- neum</i> Tolm. et Petrovsky	Sibirien	1976/M	0,1	0,3	0,2	0	0	0	
<i>P. pavoninum</i> Fisch. & C.A.Mey.	Iran	1900/M	0	0	0	0	0	0	
	Rußland	1947/M	0	0	0	0	0	0	
	Zentral-Asien	1974/M	0	0	0	0	0	0	
	Afghanistan	1977/M	0	0	0	0	0	0	
<i>P. persicum</i> Lindl.	Süddeutschland	1826/M	0,7	0,2	0,2	0	0	0	
	Süddeutschland	1846/M	7,8	0,5	0	0	0	0	
	Süddeutschland	1846/M	0,6	0,5	0,4	0,4	0	0	

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)					
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
P. pilosum	München (Hauniens)	1983	7,4	1,4	76	160	0	0,1
	München (Warschau)	1983	3,9	1,7	104	0	0	0
	Süddeutschland	1917/M	1,4	0,3	3,0	0	0	0,1
	Süddeutschland	1917/M	0,9	0,1	2,6	0	0	0
P. pinnatifidum Moris	München (Elsloo)	1983	2,0	0,4	0,7	0	0	0,1
	München (Hauniens)	1983	2,2	0,3	1,5	0,2	0	0
	?	1861/M	1,5	0	0	0	0	0
	Frankreich	1889/M	0	0,8	0	0	0	0
P. piptostigma Bienert ex Fedde	Teneriffa	1970/M	0	0	0	0	0	0
	?	? /Le	0	0	0	0	0	0
	Iran	1968/Lo	0,5	1,6	6,8	0	0	0
	Schott & Kotschy	1981/I	5,8	0,4	0,2	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	(R)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
P. polytrichum Boiss. & Kotschy	?	1910/M	0	0	0	0	0	0
	Syrien	1960/M	0	0	0	0	0	0
	Jordanien	1973/M	0,4	0,4	0	0	0	0
P. postii Fedde	Iran	1934/Lo	0,4	0,5	0	0	0	0
	Libyen	1941/Lo	6,0	0,5	0	0	0	0
	Türkei	1978/I	1,0	0,3	0	0	0	0
P. pseudo- orientale Medvedev	München	1876/M	0,3	0,1	0,8	30	0	0,1
	Türkei	1973/M	0,6	0,1	0,3	0	0	0
	Afghanistan	? /M	0,5	0,2	0,3	0	0	0,1
P. pulvinatum A. Tolm.	?	1926/Le	0	0	0	0	0	0
P. pygmaeum Rydb.	?	? /Le	0,8	1,0	0	0	0	0
P. radicans Rottb.	Norwegen	1882/M	0,1	0,2	0,5	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- Thebain	Codein	Morphin
P. rhaeticum Leresche ex Gremli	Sibirien	1971/M	0,3	0,1	0	0	0
	Grönland	1982/M	0,1	0,1	0,2	0	0
	München (Reykjavik)	1983	1,9	0,6	1,0	0	0,1
	Österreich	1898/M	1,0	0,2	0,3	0	0
	Österreich	1926/M	0,5	0,2	0,7	0	0
	Österreich	1951/M	0,2	0,2	0,3	0	0
	Italien	1955/M	0,1	0,3	1,2	0	0
	Italien	1965/M	1,4	0,4	0,7	0	0
	Süddeutschland	1779/M	0	0	0	0	0
	Westdeutschland	1936/M	0,4	0,2	0	0	0
P. rhoeas L.	Süddeutschland	1978/M	0,4	0,3	0	0	0
	München (Karlsruhe)	1983	0,4	0,2	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	(R)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
	München (Tübingen)	1983	0,2	0,2	0	0	0	0	0
P. rhopalotheca Stapf	Türkei	1971/I	0,3	0,4	0	0	0	0	0
	Türkei	1980/I	0,1	0,2	0,4	0	0	0	0
P. rubro- aurantiacum Fisch. ex Steud.	Mandschurei, China	1889/M	2,4	0,4	0,7	0	0	0	0
	Mandschurei, China	1935/M	1,2	0,6	0,7	0	0	0	0
	Mandschurei, China	1935/M	0,2	0,2	0,3	0	0	0	0
P. rupifragum Boiss. & Reut.	Süd-Spanien	1973/M	8,4	0,4	0	0	0	0	0,1
	Süd-Spanien	1975/M	9,8	1,1	0	0	0	0	0
P. sendtneri Kerner ex Hayek	Österreich	1906/M	1,4	0,4	2,4	0	0	0	0
	Süddeutschland	1963/M	9,1	4,4	0,8	0	0	0	0
	Österreich	1982/M	4,7	0,7	24	0	0	0	0
	München (Regensburg)	1983	16	1,2	2,9	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
<i>P. setigerum</i> DC.	Pyrenäen	1894/M.	1,4	3,7	0,6	5,1	6,3	38
	Griechenland	1965/M	2,6	1,6	0,6	0,8	0,8	49
	Korsika	1977/M	1,2	1,7	0,6	1,0	1,7	28
	München (Stuttgart)	1983	0,9	0,5	0,4	1,0	4,5	19
<i>P. somniferum</i> L.	?	1783/M	2,7	1,7	11	2,8	1,1	19
	?	1860/M	5,8	2,5	1,4	0,8	2,3	66
	Nanking, China	1930/M	8,6	19	2,7	108	27	106
	Süddeutschland	1962/M	12	2,9	1,8	1,8	6,0	184
	?	1976/M	55	183	25	12	43	895
<i>P. strictum</i> Boiss. & Bal. ex Boiss.	Griechenland	1892/M	2,2	1,3	2,8	0	0	0
<i>P. strigosum</i> (Boenn.) Schur.	Österreich	1905/M	0	0	0	0	0	0
	Frankreich	1973/M	0	0,8	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbarisierung und Herbar	(S)-Ret.	(R)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)	Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
P. stubendorffii A. Tolm.	?	? /Le	0,3	0,2	0	0	0	0	0
P. stylatum Boiss. & Bal. ex Boiss.	Türkei	1977/I	0,8	0,1	0	0	0	0	0
	Türkei	1978/I	0,3	0	0,3	0	0	0	0
	Türkei	? /G	0,8	0	0	0	0	0	0
P. suaveolens Lapeyr.	Pyrenäen	1877/M	1,6	1,2	0,9	0	0	0	0
	Pyrenäen	1928/M	1,5	0,6	1,8	0	0	0	0
	Süd-Spanien	1969/M	18	11	0,5	0	0	0	0,2
P. syriacum Boiss. & Blaude ex Boiss.	Syrien	1957/M	1,1	1,1	0	0	0	0	0
	Libanon	1965/M	0	0	0	0	0	0	0
	Libanon	1965/M	0	0	0	0	0	0	0
P. tartricum Nyar.	Karpaten	1861/M	0,2	0,3	1,4	0	0	0	0
	Schweiz	1888/M	1,9	0,9	2,4	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
	Ungarn	1928/M	0,4	0,3	1,2	0	0	0
	Karpaten	1931/M	0,8	0,2	1,0	0	0	0
	Schweiz	1961/M	1,0	0,4	4,0	0	0	0
	Schweiz	1961/M	1,9	0,6	2,0	0	0	0
P. tauricola Boiss.	Irak	1957/M	0,9	0,7	0,3	0	0	0
	Irak	1957/M	0,3	0,3	2,1	0	0	0
	Türkei	1971/M	2,4	0,9	414	6,2	0	0
	München (Wuppertal)	1983	6,7	5,1	51	61	0,2	0,1
P. tenellum A. Tolm.	Rußland	1968/M	0,4	0,6	1,9	0	0	0
P. tenuifolium Boiss. & Hohen. ex Boiss.	Iran	1974/M	0	1,0	0	0	0	0
P. tenuissimum Fedde	?	1807/Lo	0,4	0,4	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 10
Pflanze Herkunft

Pflanze	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)					Morphin
			(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	
P. trinitii- folium Boiss	Türkei	1957/M	10	0,5	0,5	0	0	0
	Türkei	1971/M	17	0,8	0,6	0	0	0
	Türkei	1977/M	1,7	0,4	0,4	0	0	0
P. virchowii Asch. & Sint. ex Boiss.	Türkei	1978/I	0,2	0	0	0	0	0
	Türkei	1978/I	0,2	0,1	0,1	0	0	0
	Türkei	1978/I	0,5	0,1	0	0	0	0
	Türkei	1978/I	0,6	0,1	0	0	0	0
	Türkei	? /G	0,2	0,1	0	0	0	0
P. walpolei A.E. Porsild	Sibirien	1959/M	0,4	0,3	0	0	0	0

Dies demonstriert eindrucksvoll die hohe Stabilität der untersuchten Alkaloide und zeigt, daß das Alter des Herbarmaterials für den Nachweis der Substanzen von untergeordneter Bedeutung ist. Die Ergebnisse dieser Herbarpflanzen-Analysen können also durchaus bei chemotaxonomischen Untersuchungen herangezogen werden. Allerdings zeigen die in Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse, daß es notwendig ist, mehrere Herkünfte einer Papaver-Art zu analysieren, bevor Aussagen, die Taxonomie betreffend, gemacht werden können. Bei manchen Arten, z. B. bei P. sendtneri, ist die Alkaloid-Zusammensetzung immer konstant und unabhängig von der Herkunft der untersuchten Pflanze. Dagegen weisen andere Arten eine starke Variation in ihren Alkaloiden auf. Dies zeigt sich beispielsweise bei P. stylatum; hier besitzen alle drei analysierten Herkünfte eine andere Alkaloid-Zusammensetzung.

Insgesamt wurden 100 Papaver-Arten radioimmunologisch analysiert; bei den meisten Arten standen mehrere Herkünfte zur Verfügung. Nur in drei Papaver-Arten konnte keines der sechs Alkaloide nachgewiesen werden; dies waren P. arenarium, von der drei Herkünfte getestet wurden, P. pavoninum - von

Tab. 10: (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin-, Thebain-, Codein- und Morphin-Gehalt von Blattproben herbarisierter Papaver-Pflanzen. Verwendete Abkürzungen für die Herbarien: F = Senkenbergisches Museum Frankfurt; G = Herbar der Universität Göttingen; I = Herbar der Universität Istanbul; Le = Herbar der Universität Leningrad; Lo = Kew Garden London; M = Herbar der Ludwig-Maximilians-Universität München. Wenn die Angabe der Herbarherkunft fehlt, handelt es sich um selbst angelegte Herbarpflanzen (vgl. II.1.2.), die im Institut für Pharmazeutische Biologie, München, angezogen worden sind (vgl. II.1.1.). Bei diesen Pflanzen ist in Klammern jeweils die Herkunft des Samenmaterials angegeben. Sofern ein Alkaloidgehalt von 0 eingetragen ist, bedeutet das, daß der Gehalt unterhalb der im Text angegebenen Nachweisgrenze liegt.

dieser Art wurden vier Herkünfte untersucht - und P. pulvifatum - hier stand nur eine Herkunft zur Verfügung. In allen übrigen Arten waren zumindest (S)- und/oder (R)-Retikulin vertreten. Das häufige Auftreten dieser Substanzen ist insofern nicht erstaunlich, als Retikulin nicht nur eine biosynthetische Vorstufe der Morphinane darstellt, sondern sich auch andere Isochinolinalkaloide von diesem Benzylisochinolin ableiten lassen (vgl. CORDELL, 1981).

Die (S)- und (R)-Retikulin-Konzentrationen waren in der Regel sehr gering; sie lagen vielfach unter $1 \times 10^{-3} \%$ des Trockengewichts. Den höchsten sowohl (S)- als auch (R)-Retikulin-Gehalt wies eine Herkunft von P. somniferum mit 0,055 bzw. 0,183 % des Trockengewichts auf. Daneben konnte für einzelne Exemplare von P. acrochaetum, P. atlanticum, P. cylindricum, P. sendtneri, P. suaveolens und P. triniifolium überdurchschnittlich hohe Gehalte (0,008 - 0,042 %) von (S)- und/oder (R)-Retikulin ermittelt werden.

Das Vorkommen von Salutaridin konnte eindeutig bei 35 Papaver-Arten gezeigt werden, da jeweils mehrere Pflanzen das Alkaloid enthielten. Darüber hinaus war bei weiteren 27 Arten in einer untersuchten Herkunft das Alkaloid nachweisbar; hier müßte weiteres Material getestet werden, um eine eindeutige Aussage darüber machen zu können, ob diese Papaver-Arten die Fähigkeit zur Biosynthese des Morphinandienons besitzen.

Ebenso wie die Retikulin-Konzentrationen lagen auch die Salutaridin-Konzentrationen oft unter $1 \times 10^{-3} \%$ des Trockengewichts. Dennoch wiesen einige Pflanzen signifikant höhere Gehalte ($>0,1 \%$) auf; dies waren P. acrochaetum (Armenien), P. bracteatum (München), P. caucasicum (Kaukasus und Süddeutschland), P. lasiothrix (Türkei) sowie P. persicum (München). Der höchste Salutaridin-Gehalt von 0,414 % wurde für eine P. tauricola-Pflanze ermittelt, die in der Türkei gefunden worden war.

Eine nicht so weite Verbreitung wie Salutaridin zeigt das Alkaloid Thebain. Es konnte insgesamt in 21 Papaver-Arten nachgewiesen werden; allerdings war es nur bei 10 Arten in mehreren Pflanzen-Exemplaren verschiedener Herkunft vertreten. Den höchsten Thebain-Gehalt von 0,6 % des Trockengewichts besaß eine in der Türkei gesammelte Pflanze von P. cylindricum. Daneben waren erwartungsgemäß in P. bracteatum größere Thebain-Mengen zu finden; dies ist die eingangs erwähnte Papaver-Art, die in Hinblick auf eine industrielle Gewinnung von Thebain bearbeitet worden ist (vgl. I).

Die vom pharmazeutischen Standpunkt aus gesehen interessantesten Alkaloide Codein und Morphin sind bislang in P. somniferum und P. setigerum gefunden worden. Darüber hinaus berichtet SLAVIK (1980) über das Vorkommen von sehr geringen Mengen (0,023 %) Morphin in einer Kapsel von P. decaisnei. In den hier beschriebenen Untersuchungen konnten in P. decaisnei allerdings nur die beiden Enantiomeren des Retikulins nachgewiesen werden; es müßten also weitere Exemplare dieser Art, insbesondere unter Benutzung von Kapselmaterial, analysiert werden, um den Befund von SLAVIK (1980) zu bestätigen.

Von den in dieser Arbeit getesteten Papaver-Arten konnten signifikante Mengen Codein und Morphin, außer in P. somniferum und P. setigerum in einer Herkunft (Türkei) von P. gracile sowie in zwei Herkunft (Türkei, Irak) von P. cylindricum nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren Spuren von Codein und/oder Morphin in 15 weiteren Papaver-Arten vorhanden, nämlich in P. acrochaetum, P. aculeatum, P. atlanticum, P. bracteatum, P. caucasicum, P. heldreichii, P. malviflorum, P. orientale, P. paucifoliatum, P. persicum, P. pilosum, P. pseudo-orientale, P. rupifragum, P. suaveolens und P. tauricola. Ob diese Meßwerte tatsächlich auf das Vorkommen von Codein bzw. Morphin zurückzuführen sind, oder ob sie auf Interferenzen anderer Alkaloide beruhen, müßte in weitergehenden Experimenten geklärt werden.

7.2. Bestimmung der Opiumalkaloide in Pflanzen verschiedener Papaver-Arten

Neben der Herbarpflanzen stand von einigen Papaver-Arten Samenmaterial zur Verfügung, aus dem Pflanzen angezogen wurden (vgl. II.1.1.), um frisches Material für radioimmunologische Bestimmungen zur Verfügung zu haben. Die Ergebnisse dieser Tests sollten mit den Befunden verglichen werden, die die Untersuchungen der herbarisierten Pflanzen ergeben hatten. Die Richtigkeit der taxonomischen Bezeichnung der Pflanzen war, wie unter II.1.2. angegeben, zuvor überprüft worden. Die Pflanzen wurden, wie in Abschnitt II.1.3. beschrieben, aufgearbeitet und die Extrakte mit Hilfe der sechs Radioimmuntests analysiert. Das Ergebnis der Tests zeigt Tabelle 11.

Unter den verwendeten Bedingungen betrugen die ungefähren Nachweisgrenzen $2 \times 10^{-5} \%$ (S)-Retikulin, $5 \times 10^{-5} \%$ (R)-Retikulin, $2 \times 10^{-4} \%$ Salutaridin, $4 \times 10^{-5} \%$ Thebain und $2 \times 10^{-5} \%$ Codein bzw. Morphin, jeweils bezogen auf das Trockengewicht.

(S)- und (R)-Retikulin waren in 27 der insgesamt 29 analysierten Papaver-Arten enthalten; nur in P. alboroseum und P. argemone konnten die zwei Enantiomere nicht nachgewiesen werden. In Herbarpflanzen dieser Art waren beide Retikulin-Isomere jedoch in geringen Mengen vorhanden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß auch diese Papaver-Arten prinzipiell zur Bildung dieser Benzylisochinoline befähigt sind und lediglich die getesteten Proben die Substanzen nicht enthielten.

Salutaridin konnte in 17 Papaver-Arten nachgewiesen werden, und zwar meist in mehreren Pflanzen-Exemplaren, die aus Samenmaterial unterschiedlicher Herkunft angezogen worden waren. Das Auftreten des Alkaloids in diesen Arten steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Herbarpflanzen-Analyse. 12 Papaver-Arten wiesen das Morphinandienon nicht auf.

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)					
		(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
P. alboroseum Hult.	Leningrad	0	0	0	0	0	0
P. alpinum L.	Marburg	0,77	0,67	7,5	1,3	0	0
	Nijmegen	0,34	0,95	4,9	0	0	0
	Regensburg	5,0	1,5	12	0	0	0
P. apulum Ten.	Cambridge	1,2	0	0	0	0	0
P. argemone L.	Leipzig	0	0	0	0	0	0
	Marburg	0	0	0	0	0	0
	Tübingen	0	0	0	0	0	0
P. armeniacum (L.)DC.	Göteborg	4,3	1,4	7,0	1,1	0	0
P. atlanticum (Ball)Coss.	Aachen	4,2	0,71	0	0	0	0
	Bochum	11	1,4	0	3,5	0	0
	Bochum	14	1,4	0	0,36	0	0,27
	Bonn	2,1	0,82	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)				Morphin
		(S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein
	Debreczin	8,5	1,9	0	0	0
	Izmir	9,9	1,5	0	0	0
	Karlsruhe	9,8	1,1	0	0	0
	Rotterdam	8,5	1,1	0	0	0
	Stuttgart	14	1,4	0	0	0
	Triest	13	1,9	0	0	0
P. bracteatum Lindl.	Antwerpen	1,7	5,0	91	0,40	0
	Antwerpen	1,8	0,51	6,5	98	0,22
	Brüssel	2,7	0,29	0	0	0
	Fribourg	1,2	0,49	15	0	0,38
	Kiel	4,1	0,89	6,5	260	0
	Linz	1,0	0,20	0	0	0
	Marburg	2,7	0,49	1,7	0	0

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
	Marburg	2,0	0,52	8,2	51	0,1	0
	Nijmegen	0,31	0,26	0	0	0	0,35
	Rostock	1,4	0,48	1,6	0	0	0
	Rotterdam	1,6	1,5	11	0	0	0
	Wuppertal	0,89	0,94	6,1	0	0	0
P. burseri Crantz.	Izmir	7,2	1,5	0	0	0	0
P. californicum A. Gray	Genf	1,1	0,78	3,7	0	0	0
P. caucasicum Bieb.	Genf	0,73	0,63	1,4	0	0	0,11
	Krefeld	8,6	1,5	0	0,61	0	0,40
	Warschau	5,2	4,3	76	0	0	0
	Warschau	0,60	0,78	6,5	0	0	0
P. commutatum Fisch & C.A. Mey	Bochum	15	1,4	0	0	0	0
	Destelbergen	6,3	1,2	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts)				Morphin
		(S)-Ret.	(R)-Ret.	Salutaridin	Thebain	
P. dubium L.	Krefeld	12	1,1	0	0	0
	Nijmegen	3,1	1,2	1,6	0,66	0
	Warschau	4,3	0,87	0	0	0
	Göttingen	0,21	0,11	0	0	0
	Mainz	0,32	0,11	0	0	0
P. fauriei Fedde	Peznom	0,34	0,20	0	0	0
	Jena	0,39	0	0	0	0
	München	0,95	2,0	9,7	5,1	0
	St. Gallen	1,8	0,93	5,8	0	0
	München	0	0,12	0	0	0
P. glaucum Boiss. & Hausskn.	Izmir	3,3	3,9	2,8	4,0	93
	Karlsruhe	2,2	0	0	1,2	0
	Marburg	1,5	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
P. kernerii Hayek	Jena	4,0	0,72	3,0	0	0	0
	London	0,61	0,83	5,7	0	0	0
P. lateritium C. Koch	Nancy	13	1,1	0	0	0	0,25
P. nudicaule L.	München	0	0,28	0,86	0	0	0
	Weihenstephan	0,26	0,27	2,6	0	0	0
	Wuppertal	0,27	0,45	2,2	0	0	0
P. oreophilum Rupr.	Stuttgart	2,1	0,71	0	0	0	0
P. orientale L.	Aachen	4,0	0,52	1,1	0,23	0	0,27
	Antwerpen	1,5	0,64	7,5	0	0,86	0
	Budapest	1,5	0,25	1,1	0,13	0	0,21
	Destelbergen	1,8	5,5	60	0,38	0	0,53
	Halle	2,8	6,7	19	67	0,11	0,85
	Kiew	1,4	2,5	50	0,50	0	0

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts)				
		(S)-Ret.	(R)-Ret.	Salutaridin	Thebain	Codein
	Leipzig	2,8	0,31	0	0	0
	Leningrad	2,2	0,96	0,57	0	0
	Mainz	1,7	0,25	0	0	0
	Marburg	2,4	2,5	4,7	108	0,11
	Warschau	1,6	2,7	29	0	0
	Eisloo	6,4	1,4	1,2	0	0
	Reykjavik	1,1	0,86	3,4	0	0
	Bern	0,55	0,67	4,9	0	0
	Bochum	0,50	0,28	0	0	0
	Göttingen	0	0	0	0	0
	Izmir	0,23	0,20	0	0	0
	Karlsruhe	0,23	0,13	0	0	0
	London	0,27	0,10	0	0	0

P. persicum
Lindl.

P. pilosum
Sibth. & Sm.

P. radicans
Rottb.

P. rhaeticum
Leresche ex Gremli

P. rhoas
L.

Morphin

Fortsetzung Tab. 11

Pflanze	Herkunft des Samenmaterials	(S)-Ret.	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (R)-Ret.	Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
	Moskau	0,39	0,22	0	0	0	0
	Tübingen	0,94	0,91	0	0	0	0
	Turku	0,70	0,23	0	0	0	0
P. setigerum DC.	Stuttgart	2,2	2,8	1,2	1,7	4,3	52
P. tauricola Boiss.	Wuppertal	2,8	1,7	36	0,11	0	0,62

Tab. 11: Gehalt der sechs Opiumalkaloide in Pflanzen verschiedener Papaver-Arten, ermittelt durch die Analyse von Blattextrakten mit Hilfe der Radioimmuntests für (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin. Sofern ein Alkaloidgehalt von 0 angegeben ist, bedeutet dies, daß er unterhalb der im Text angegebenen Nachweisgrenzen liegt. Die Anzucht und Aufarbeitung der Pflanzen erfolgte wie unter II.1.1. und II.1.3. beschrieben.

Die Untersuchung von Herbarmaterial hatte jedoch bei vier dieser Arten, nämlich bei P. argemone, P. fauriei, P. glaucum und P. lateritium jeweils bei einer Herkunft positive Meßwerte ergeben. Hier sollte weiteres Material untersucht werden, um eindeutige Aussagen darüber machen zu können, ob diese Papaver-Pflanzen die Kapazität zur Salutaridin-Biosynthese besitzen. Der höchste Salutaridin-Gehalt von 0,091 % wurde für eine P. bracteatum-Pflanze (Herkunft des Samens: Antwerpen) ermittelt. Diese Konzentration war jedoch deutlich geringer als der maximale Gehalt, der bei den Herbarpflanzen-Analysen gefunden wurde (0,414 % bei P. tauricola). Eine Vermehrung der P. bracteatum-Pflanze zum Zweck der Selektion eines Stammes, der hohe Salutaridin-Gehalte aufweist und zur Gewinnung des Alkaloids eingesetzt werden kann, erschien deshalb nicht lohnenswert.

Thebain wurde in insgesamt 12 Papaver-Arten gefunden. Die Ergebnisse der Thebain-Bestimmung stehen jedoch nur teilweise in Übereinstimmung mit den Herbaruntersuchungen. So wurde das Alkaloid in frischem Material von P. alpinum, P. atlanticum, P. commutatum und P. hybridum nachgewiesen, allerdings jeweils nur in einer Pflanze. Herbarpflanzen dieser Arten enthielten dagegen kein Thebain. Auch hier sind also weitere Experimente erforderlich, um genaue Aussagen machen zu können. Von den getesteten Pflanzen zeichneten sich keine durch einen auffallend hohen Thebain-Gehalt aus. Die maximale Konzentration des Alkaloids betrug 0,26 % (P. bracteatum). Dieser Wert liegt damit deutlich unter dem höchsten Wert, der bei den Herbarpflanzen ermittelt worden war (0,6 % bei P. cylindricum).

Signifikante Mengen der Alkaloide Codein und Morphin waren in einer Pflanze von P. gracile enthalten. Dies entspricht jedoch den Erwartungen, da in einem herbarisierten Exemplar dieser Art, das aus dem gleichen Samenmaterial angezogen worden war, ebenfalls die Alkaloide vertreten waren.

Darüber hinaus waren, in Übereinstimmung mit den Herbaruntersuchungen, Spuren von Codein und/oder Morphin in P. atlanticum, P. bracteatum, P. caucasicum, P. orientale und P. tauricola vorhanden. Hier sind, wie bereits ausgeführt (vgl. III. 7.1.), weitere Tests erforderlich, um zu überprüfen, ob diese Arten tatsächlich in beschränktem Maße zur Bildung dieser Alkaloide befähigt sind.

7.3. Selektionsuntersuchungen an Papaver somniferum-Pflanzen verschiedener Herkünfte

Mit den Radioimmuntests bot sich die Möglichkeit, in einem umfangreichen Screening-Versuch den Gehalt der sechs Opiumalkaloide von Papaver somniferum-Pflanzen verschiedener Herkünfte zu ermitteln und auf diese Weise Pflanzen mit gewünschten Alkaloid-Zusammensetzungen und -Gehalten zu selektionieren. In erster Linie wäre es interessant, eine Pflanze mit einem hohen Codein-Gehalt und geringen Konzentrationen der anderen Alkaloide zu finden. Industriell werden große Mengen Codein benötigt, da dieses Alkaloid als Antitussivum therapeutisch eingesetzt wird.

Aus Samenmaterial von Papaver somniferum, das von Botanischen Gärten und Instituten zur Verfügung gestellt worden war, wurden insgesamt 372 Pflanzen 75 unterschiedlicher Herkünfte angezogen (vgl. II.1.1.). Die verschiedenen Pflanzen wiesen große Unterschiede in ihrer Größe und vor allem in der Farbe und Form ihrer Blüten auf. Photographische Aufnahmen einiger Blüten zeigt Abbildung 34.

Wie unter II.1.3. beschrieben, wurden von jeder Pflanze Latex-, Blatt- und Stengelproben entnommen, extrahiert und mit Hilfe der sechs Radioimmuntests analysiert. Die Alkaloid-Mengen der Latexproben wurden jeweils pro 1 µl Latex berechnet. Die Gehalte der Blätter und Sproßachsen wurden auf das Trockengewicht bezogen. Die Häufigkeitsverteilungen der Alka-

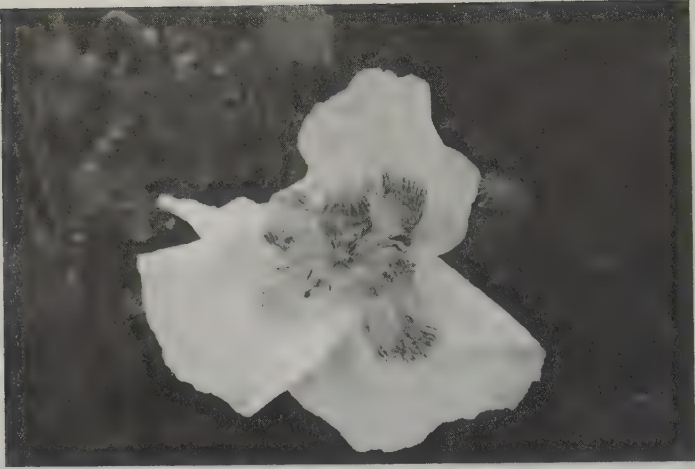
lidgehalte, jeweils im Latex, im Blatt und in der Sproßachse, zeigen die Abbildungen 35-40.

Die Benzylisochinoline (S)- und (R)-Retikulin waren in allen Latexproben und in über 98 % der analysierten Blatt- und Stengelproben nachweisbar. Aus Abbildung 35 geht hervor, daß im Latex ein (S)-Retikulin-Gehalt von 3,3 - 3,6 µg/µl mit maximaler Häufigkeit auftrat. Die Häufigkeitsverteilungen der Gehalte von den Blättern und Sproßachsen (35 B,C) zeigen, daß in den Blättern größere Mengen (S)-Retikulin vorhanden waren als in den Stengeln. Das Maximum der relativen Häufigkeit lag bei den Blättern bei einem Gehalt von 0,0061 - 0,0080 % des Trockengewichts; dagegen waren bei den Stengelproben Konzentrationen von weniger als 0,002 % des Trockengewichts am häufigsten vertreten.

Die Gehalte des (R)-Enantiomers vom Retikulin waren in der Regel niedriger als die des (S)-Enantiomers. Abbildung 36 zeigt, daß über 14 % aller getesteten Pflanzen im Latex eine (R)-Retikulin-Konzentration von 0,8 - 0,9 µg/µl aufwiesen; im Falle der Blätter lag das Maximum der Häufigkeit bei Gehalten von 0,0031 - 0,0040 % des Trockengewichts, im Falle der Sproßachsen bei geringeren Konzentrationen von 0,0006 - 0,0010 % des Trockengewichts. Damit waren die Mengen des (R)-Retikulins durchschnittlich um den Faktor 2-4 niedriger als die des (S)-Enantiomers. Die höchsten Gehalte, die von (S)- und (R)-Retikulin in den Latex-, Blatt- und Stengelproben gemessen wurden, sind in Tabelle 12 angegeben.

Für alle getesteten Latexproben wurde jeweils das Verhältnis zwischen dem (S)- und (R)-Retikulin-Gehalt berechnet. Hierbei zeigte sich, daß die Quotienten nicht bei allen Pflanzen konstant waren, sondern in einem Bereich von 0,4 - 62 streuten. Die Häufigkeitsverteilung der Verhältnismerte ist in Abbildung 41 dargestellt. Das Maximum der Häufigkeit liegt bei einem Verhältnis der beiden Enantiomere von 2,5 - 3,2. Mehr als 90 % der Pflanzen enthielten eine größere Menge

A



B



C



D



Abb. 34: Blüten von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkünfte. A. Aachen; B. London; C. und D. Izmir.

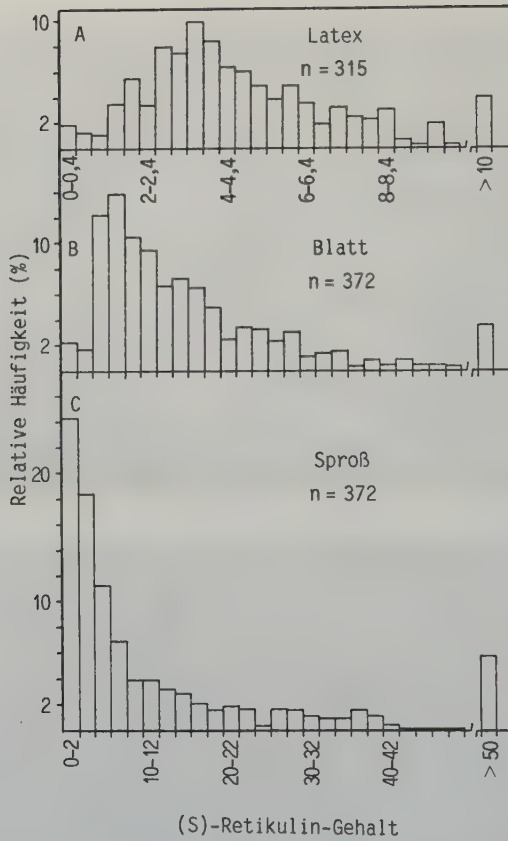


Abb. 35: Häufigkeitsverteilung von (S)-Retikulin-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von Papaver somniferum-Pflanzen verschiedener Herkünfte. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in $10^{-3} \%$ TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

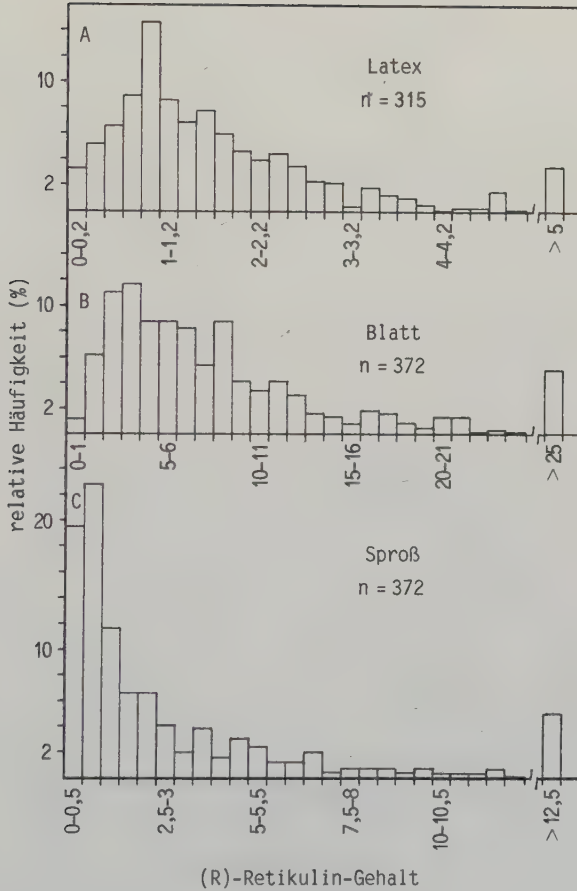


Abb. 36: Häufigkeitsverteilung von (R)-Retikulin-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkünfte. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in $10^{-3} \%$ TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

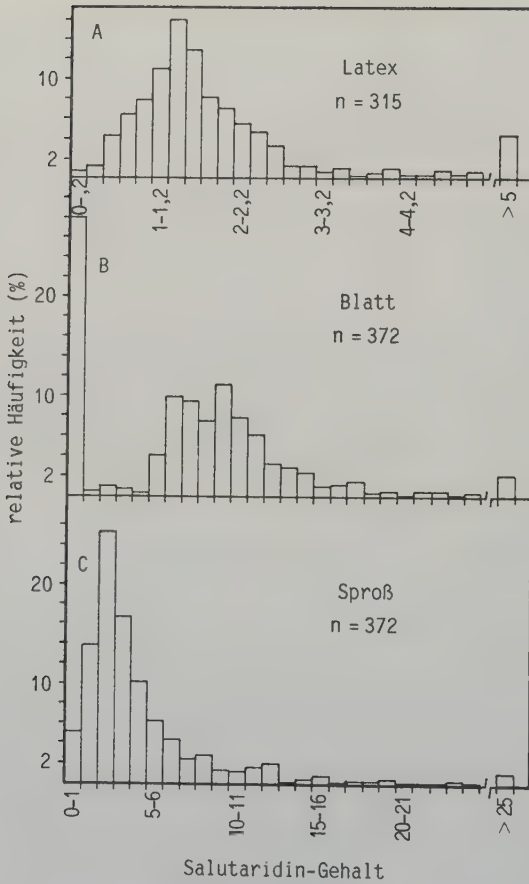


Abb. 37: Häufigkeitsverteilung von Salutaridin-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkünfte. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in 10⁻³ % TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

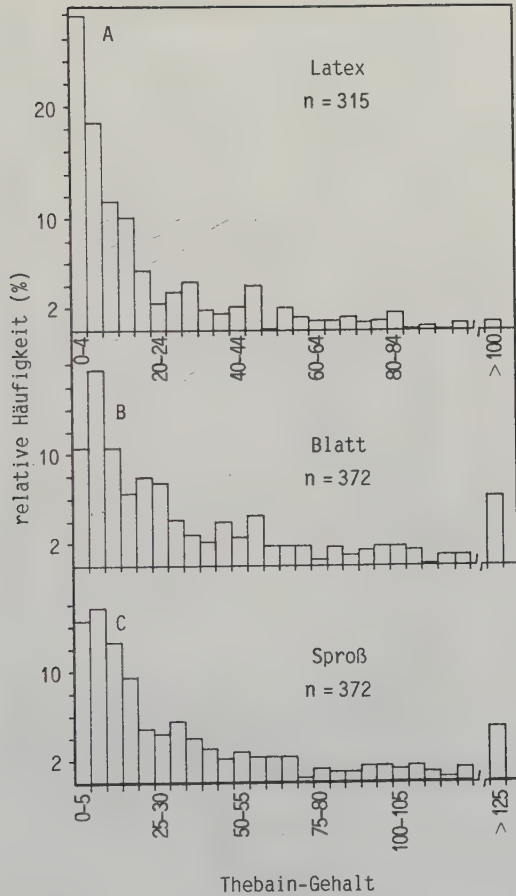


Abb. 38: Häufigkeitsverteilung von Thebain-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkunft. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in $10^{-3}\%$ TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

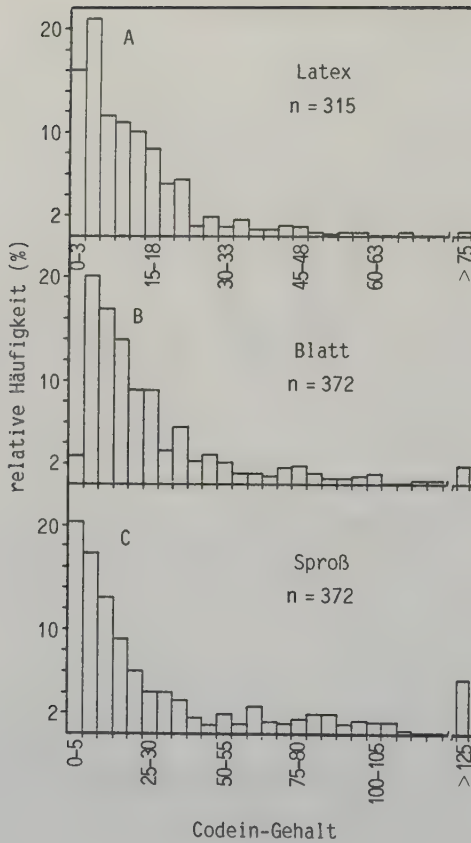


Abb. 39: Häufigkeitsverteilung von Codein-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkünfte. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in 10^{-3} % TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

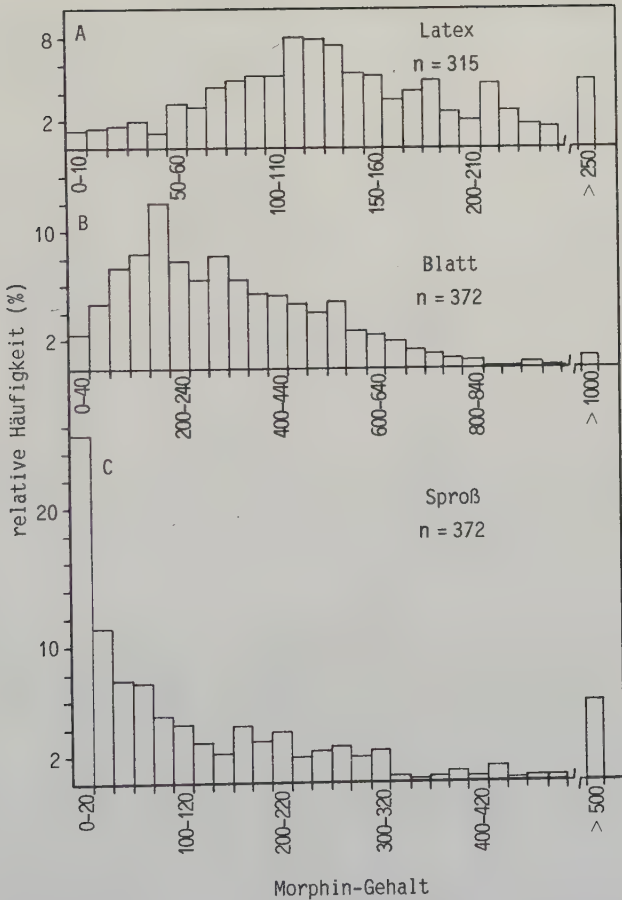


Abb. 40: Häufigkeitsverteilung von Morphin-Gehalten in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkünfte. Die Latex-Gehalte sind in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in $10^{-3} \%$ TG. Aufarbeitung der Proben: vgl. 11.1.3.

Alkaloid	Pflanzenteil	Gehalt		Herkunft
(S)-Retikulin	Latex	68	µg/µl	Leningrad
	Blatt	0,26	% TG	Lyon
	Sproß	0,29	% TG	Göttingen
(R)-Retikulin	Latex	13	µg/µl	Turku
	Blatt	0,45	% TG	Lyon
	Sproß	0,050	% TG	Krefeld
Salutaridin	Latex	17	µg/µl	Latvia
	Blatt	0,040	% TG	Turku
	Sproß	0,040	% TG	Cluj-Napoca
Thebain	Latex	200	µg/µl	Liverpool
	Blatt	0,40	% TG	Turku
	Sproß	0,76	% TG	Wisley
Codein	Latex	79	µg/µl	Duisburg
	Blatt	0,64	% TG	Wisley
	Sproß	1,4	% TG	
Morphin	Latex	430	µg/µl	Cluj-Napoca
	Blatt	2,8	% TG	Wisley
	Sproß	3,9	% TG	

Tab. 12: Maximale Gehalte der sechs radioimmunologisch bestimmbaren Opiumalkaloide in Latex-, Blatt- und Sproß-Proben von 372 *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener geographischer Herkünfte.

(S)- als (R)-Retikulin. Ein ähnliches Ergebnis ergaben Arbeiten von BROCHMANN-HANSEN und NIELSEN (1965) sowie BATTERSBY et al. (1965a). Beide Autorengruppen untersuchten das Verhältnis der beiden Retikulin-Enantiomere in Opium bzw. in ganzen *Papaver somniferum*-Pflanzen. Sie kamen jeweils zu dem Ergebnis, daß (S)- gegenüber (R)-Retikulin überwiegt. Allerdings geben die Autoren für die Retikulinfraktion des eingetrockneten Milchsafte oder der Pflanzen ein definiertes Verhältnis der beiden Stereoisomeren an. BROCHMANN-HANSEN und NIELSEN (1965) führen an, daß die Retikulinfraktion von Opium zu 60 %

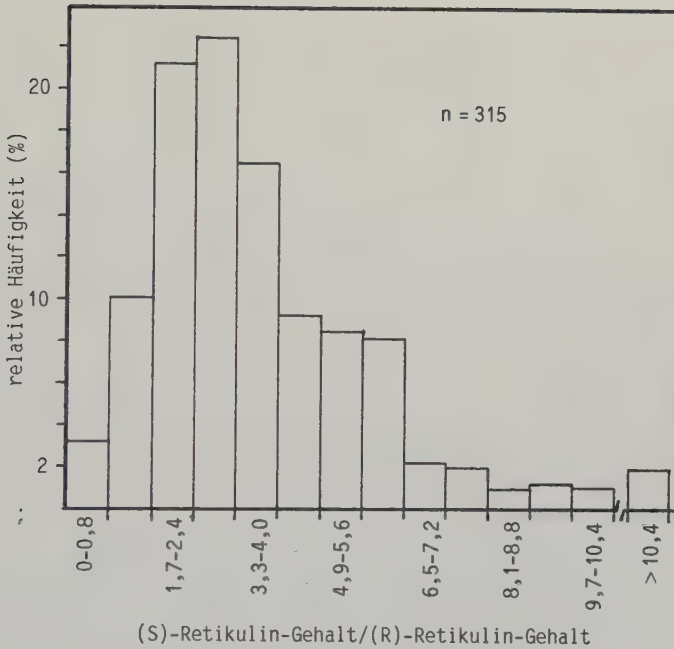


Abb. 41: Häufigkeitsverteilung der (S)-Reticulin/(R)-Reticulin-Verhältnisse in Latexprouben von Papaver somniferum-Pflanzen verschiedener Herkunft. (Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.).

aus dem (S)- und zu 40 % aus dem (R)-Isomer besteht. BATTERS-BY et al. (1965a) fanden in Extrakten ganzer Papaver somniferum-Pflanzen einen sechsfachen Überschuß des (S)-Reticulins gegenüber dem (R)-Enantiomer. Die in dieser Arbeit durchgeführten radioimmunologischen Analysen haben gezeigt, daß das Verhältnis von (S)- zu (R)-Reticulin sowohl im Milchsaft, als auch in den Blättern und Sproßachsen vom Schlafmohn bei verschiedenen Pflanzenindividuen in starkem Maße variiert.

Die Bestimmungen von BROCHMANN-HANSEN und NIELSEN (1965) sowie von BATTERSBY et al. (1965a) gelten demnach nur für das jeweilige Untersuchungsmaterial und ein bestimmtes Entwicklungsstadium und können nicht auf andere Pflanzen übertragen werden.

Abbildung 37 zeigt die Häufigkeitsverteilungen der Salutaridin-Gehalte im Latex, sowie in den Blättern und Sproßachsen der analysierten Pflanzen. Die Konzentrationen des Morphinandienons lagen in der gleichen Größenordnung wie die der Enantiomere des Retikulins. Mit maximaler Häufigkeit trat in den Latexproben ein Gehalt von 1,3 - 1,4 µg/µl auf. In den Blättern war das Alkaloid nur in geringen Mengen vorhanden; in annähernd 28 % aller Proben lag seine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der radioimmunologischen Bestimmung. Die Sproßachsen wiesen meist geringfügig höhere Salutaridin-Mengen als die Blätter auf. Am häufigsten waren Gehalte von 0,0021 - 0,0030 % des Trockengewichts zu finden. Die maximalen Salutaridin-Konzentrationen, die ermittelt wurden, betrugen 17 µg/µl im Latex und 0,04 % des Trockengewichts im Blatt bzw. in der Sproßachse (vgl. Tab. 12). Eine Pflanze mit einem auffallend hohen Salutaridin-Gehalt (>1 %), die zur Züchtung eines Salutaridin-produzierenden Papaver somniferum-Stammes eingesetzt werden könnte, war unter den 372 analysierten Pflanzen nicht vorhanden.

Das Alkaloid Thebain konnte in allen Latex- und Stengelproben sowie in 370 der 372 analysierten Blattproben nachgewiesen werden. Die Thebain-Gehalte der Pflanzen waren durchschnittlich 5-20fach höher als die Salutaridin- und Retikulin-Gehalte. Dies kann aus Abbildung 38 abgelesen werden, die zeigt, daß die Konzentrationen des Thebains sowohl im Latex als auch in den Blättern und Sproßachsen über einen weiteren Bereich streuen als die von (S)- und (R)-Retikulin sowie Salutaridin. Mit größter Häufigkeit treten im Latex Gehalte von weniger als 4 µg Thebain pro µl auf. Die Thebain-

Konzentrationen in den Blättern und Sproßachsen sind ungefähr gleich hoch. In beiden Fällen waren mit größter Häufigkeit Proben mit einem Gehalt von 0,0050 - 0,010 % des Trockengewichts zu finden. Die höchsten Thebainkonzentrationen, die unter den analysierten Pflanzen auftraten, betrugen 200 µg/µl im Milchsafte, 0,40 % im Blatt und 0,76 % in der Sproßachse (vgl. Tab. 12).

Die Häufigkeitsverteilungen der Codein-Gehalte zeigt Abbildung 39. Dieses Alkaloid war in allen analysierten Pflanzen nachweisbar. Im Latex traten Codein-Konzentrationen von 3,1 - 6,0 µg/µl, in den Blättern von 0,0050 - 0,010 % und in den Sproßachsen von weniger als 0,0050 % mit größter Häufigkeit auf. Sie liegen damit in der gleichen Größenordnung wie die Thebain-Konzentrationen. Allerdings waren die höchsten Codein-Gehalte, die in den Blättern und Sproßachsen gefunden wurden, mit 0,64 bzw. 1,4 % etwa doppelt so hoch wie die maximalen Thebain-Gehalte. Im Latex wurden dagegen nur maximal 79 µg Codein pro µl gefunden; dieser Wert lag damit deutlich niedriger als der höchste Thebain-Gehalt (200 µg/µl) (vgl. Tab. 12).

In deutlich höheren Mengen als alle anderen Alkaloide war Morphin in den Pflanzen vertreten (Abb. 40). Die Morphin-Gehalte der Milchsafteproben streuten über einen weiten Bereich von 5,8 - 430 µg/µl. In den Blättern war im Durchschnitt mehr Morphin vorhanden als in den Sproßachsen. Dies zeigt sich darin, daß die Blätter mit größter Häufigkeit Gehalte von 0,16 - 0,20 % aufwiesen; dagegen waren in den Sproßachsen Gehalte von unter 0,02 % am meisten vertreten. Allerdings lag der höchste Morphin-Gehalt der Sproßachsen bei 3,9 %, während er bei den Blättern nur 2,8 % betrug (vgl. Tab. 12).

Zur Züchtung von Hochleistungsstämmen sind nicht nur solche Pflanzen interessant, die viel Codein, Morphin oder eine der biosynthetischen Vorstufen enthalten. Da industriell

in erster Linie Codein als Antitussivum benötigt wird (vgl.I), sollten darüber hinaus Pflanzen selektiert werden, die ein günstiges Codein/Morphin-Verhältnis - natürlich bei einem gleichzeitig hohen Codein-Gehalt - aufweisen. Deshalb wurde bei allen getesteten Pflanzen der Quotient aus dem Codein- und Morphin-Gehalt berechnet. Die Häufigkeitsverteilungen dieser Werte für die Milchsaft-, Blatt- und Stengelproben sind in Abbildung 42 dargestellt. Sie zeigt, daß im Latex und in den Blättern das Maximum der Häufigkeit bei einem Codein/Morphin-Verhältnis von 0,02 - 0,04 bzw. 0,04 - 0,06 lag, d. h. daß Morphin meist in etwa 20-50fachem Überschuß vorlag. Dagegen war in den Sproßachsen dieses Verhältnis zugunsten von Codein verschoben. Hier trat mit größter Häufigkeit ein Quotient von 0,20 - 0,30 auf; das bedeutet, daß Morphin nur in 3-5fach höheren Mengen als Codein vorhanden war.

Von den 315 analysierten Latexproben wies nur eine Probe einen höheren Codein- als Morphin-Gehalt auf. In diesem Fall war allerdings der Absolutgehalt des Codeins mit $17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu gering, als daß eine Selektion der Pflanze lohnenswert gewesen wäre. Bei insgesamt sechs Blattproben wurde eine höhere Codein- als Morphin-Konzentration ermittelt. Auch hier betrugen jedoch die absoluten Codeinmengen in den meisten Fällen weniger als 0,1 % des Trockengewichts. Lediglich eine dieser Pflanzen besaß in ihren Blättern einen überdurchschnittlich hohen Codein-Gehalt von 0,41 %. 40 Pflanzen wiesen in ihren Sproßachsen einen Überschuß von Codein gegenüber Morphin auf. Die Pflanzen, bei denen dies gleichzeitig mit einem hohen absoluten Codein-Gehalt verbunden war, sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Aufgrund der hier dargelegten radioimmunologischen Analysen konnten von 372 Papaver somniferum-Pflanzen einige Pflanzen ausgewählt werden, die sich durch besonders hohe Gehalte eines oder mehrerer Alkaloide auszeichneten und

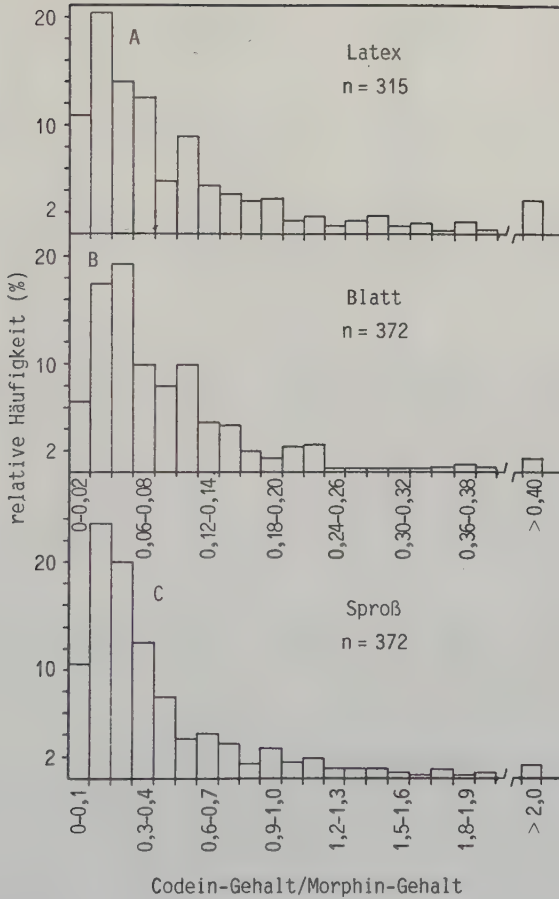


Abb. 42: Häufigkeitsverteilung der Codein/Morphin-Verhältnisse in (A) Latex-, (B) Blatt- und (C) Sproßproben von *Papaver somniferum*-Pflanzen verschiedener Herkunft. Aufarbeitung der Proben: vgl. II.1.3.

Herkunft	Gehalt (% des Trockengewichts)		Codein/Morphin
	Codein	Morphin	
Genf	0,96	0,52	1,8
Moskau	0,76	0,43	1,8
Brüssel	1,4	0,80	1,7
Izmir	0,53	0,46	1,2
Brüssel	0,54	0,49	1,1
Liège	1,2	1,1	1,1
	0,80	0,74	1,1
Brüssel	0,49	0,47	1,0

Tab. 13: Papaver somniferum-Pflanzen, die in ihren Sproßachsen günstige Codein/Morphin-Verhältnisse und gleichzeitig hohe Codein-Gehalte aufweisen.

deshalb für weitere Züchtungsvorhaben eingesetzt werden sollten. Sie sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

7.4. Bildung der Opiumalkaloide während der Keimung von Papaver somniferum

Die Radioimmuntests für die sechs Opiumalkaloide wurden eingesetzt, um die Kinetik der Alkaloidbildung in keimenden Mohnsamen während der ersten Tage der Keimung zu untersuchen. Dieses Experiment sollte Anhaltspunkte darüber liefern, in welcher Phase der Keimung die Bildung der einzelnen Morphinan-Alkaloide einsetzte und in welcher Reihenfolge und mit welcher Geschwindigkeit ihre Produktion erfolgte. Wenn bei den Keimlingen bereits ein stetiger Anstieg der radioimmunologisch erfaßbaren Alkaloide verzeichnet werden könnte und die Pflanzen demnach die Biosynthese der Morphinane durchführen würden, könnten sie sich beispielsweise als besonders geeignetes Untersuchungsmaterial erweisen für Fütterungs- und

Herkunft	Pflanzen- teil	Alkaloidgehalt (% des Trockengewichts)					
		(S)-Reti- kulin	(R)-Reti- kulin	Saluta- ridin	Thebain	Codein	Morphin
Brüssel	Latex	2,8	1,1	0,8	3,3	6,8	106
	Blatt	0,0075	0,0052	0	0,018	0,031	0,17
	Sproß	0,097	0,0084	0,015	0,21	1,4	0,76
Genf	Latex	1,8	0,4	0,8	2,6	5,9	71
	Blatt	0,0056	0,0016	0,0069	0,0066	0,021	0,30
	Sproß	0,053	0,0070	0,012	0,091	0,96	0,52
Göttingen	Latex	1,8	0,3	1,2	41	0,9	82
	Blatt	0,0091	0,0027	0,0072	0,026	0,0078	0,25
	Sproß	0,29	0,010	0,012	0,18	0,28	1,5
Jamioux	Latex	8,1	2,9	1,4	17	5,2	135
	Blatt	0,012	0,011	0	0,0039	0,0084	0,39
	Sproß	0,13	0,017	0,016	0,16	1,3	0,89
Leiden	Latex	---	---	---	---	---	---
	Blatt	0,029	0,015	0,013	0,14	0,0086	1,0
	Sproß	0,0038	0,0015	0,0029	0,032	0,0057	0,034
Liège	Latex	3,3	1,4	1,3	3,4	4,9	122
	Blatt	0,017	0,011	0	0,016	0,010	0,54
	Sproß	0,072	0,049	0,017	0,074	1,2	1,1
Wisley	Latex	1,8	0,4	1,4	14	21	201
	Blatt	0,051	0,016	0,022	0,25	0,64	2,8
	Sproß	0,040	0,0084	0,012	0,18	0,56	1,0
Wisley	Latex	3,1	1,0	1,8	27	68	335
	Blatt	0,026	0,011	0,011	0,047	0,18	0,80
	Sproß	0,023	0,0062	0,0066	0,11	0,34	0,40

Herkunft	Pflanzen- teil	Alkaloidgehalt (% des Trockengewichts)				
		(S)-Reti- kulin	(R)-Reti- kulin	Saluta- ridin	Thebain	Codein
Wisley	Latex	1,7	0,4	1,2	17	16
	Blatt	0,056	0,013	0,017	0,19	0,55
	Sproß	0,058	0,028	0,019	0,76	0,65
	Latex	2,5	1,0	1,0	3,8	2,5
	Blatt	0,0083	0,0026	0	0,021	0,054
	Sproß	0,18	0,012	0,014	0,098	0,81
	Latex	5,5	1,9	2,2	18	19
	Blatt	0,020	0,0089	0,0081	0,029	0,048
	Sproß	0,034	0,0088	0,012	0,12	0,80
	Latex	6,8	0,8	0,8	6,2	5,8
	Blatt	0,020	0,0033	0,0070	0,027	0,018
	Sproß	0,18	0,024	0,027	0,64	1,4
	Latex	---	---	---	---	---
	Blatt	0,046	0,021	0,017	0,31	0,014
	Sproß	0,024	0,0063	0,0077	0,38	0,019
	Latex	---	---	---	---	---
	Blatt	---	---	---	---	---
	Sproß	---	---	---	---	---
	Latex	---	---	---	---	---
	Blatt	---	---	---	---	---
	Sproß	---	---	---	---	---

Tab. 14: Alkaloidgehalte von selektierten Papaver somniferum-Pflanzen, die sich unter 372 getesteten Pflanzenindividuen durch besonders hohe oder besonders niedrige Alkaloidgehalte auszeichnen. Die Latex-Gehalte sind in µg/µl angegeben, die Blatt- und Sproß-Gehalte in % TG.

auch zellfreie Experimente zur Biosynthese des Morphins. Beispielsweise können Applikationsversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen an Keimlingen wesentlich einfacher und mit geringerem Einsatz an radioaktiven Substanzen erfolgen als an ausgewachsenen Papaver somniferum-Pflanzen, da mit bedeutend geringeren Mengen an Pflanzenmaterial gearbeitet werden kann.

Für die Papaver somniferum-Samen hatten sich in Vorversuchen folgende Keimungsbedingungen als am geeignetsten erwiesen: Jeweils 0,2 g gewaschene Samen wurden in einer durchsichtigen Plastikschaale (9 cm ϕ x 5 cm Höhe) mit 4 g Vermiculite und 27 ml Knop'scher Nährlösung (SCHOPFER, 1976) unter den in Abschnitt II.1.1. aufgeführten Bedingungen zur Keimung ausgesät. Jeweils nach 24 Stunden, insgesamt 8 Tage lang, wurden einige Pflanzen geerntet und entweder die intakten Keimlinge oder, nach Zerlegung in Blatt, Sproß und Wurzel, die einzelnen Pflanzenteile wie unter II.1.3. beschreiben extrahiert. Die Extrakte wurden mit Hilfe der sechs Radioimmuntests analysiert.

Die (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin-, Thebain-, Codein- und Morphin-Gehalte der ganzen Keimlinge wurden zum einen in %, bezogen auf das Trockengewicht, berechnet. Zum anderen wurden jeweils die absoluten Alkaloid-Mengen pro Pflanze ermittelt. Die zeitliche Abhängigkeit beider Größen ist in Abbildung 43 dargestellt. Während der Zeitdauer von 8 Tagen hat sich aus dem Samen ein durchschnittlich 3,5 cm langer Keimling mit 2 Keimblättern, 3-4 Primärblättchen und einer etwa 2-3 cm langen Wurzel entwickelt.

Aus Abbildung 43 B läßt sich zunächst ablesen, daß die Mengen aller sechs gemessenen Alkaloide in den Keimpflanzen innerhalb der 8tägigen Keimung anstiegen. Während die (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin- und Thebain-Mengen etwa parallel ansteigen, erfolgt die Zunahme der Codein- und Morphin-Mengen mit einer ein- bzw. dreitägigen Verzögerung.

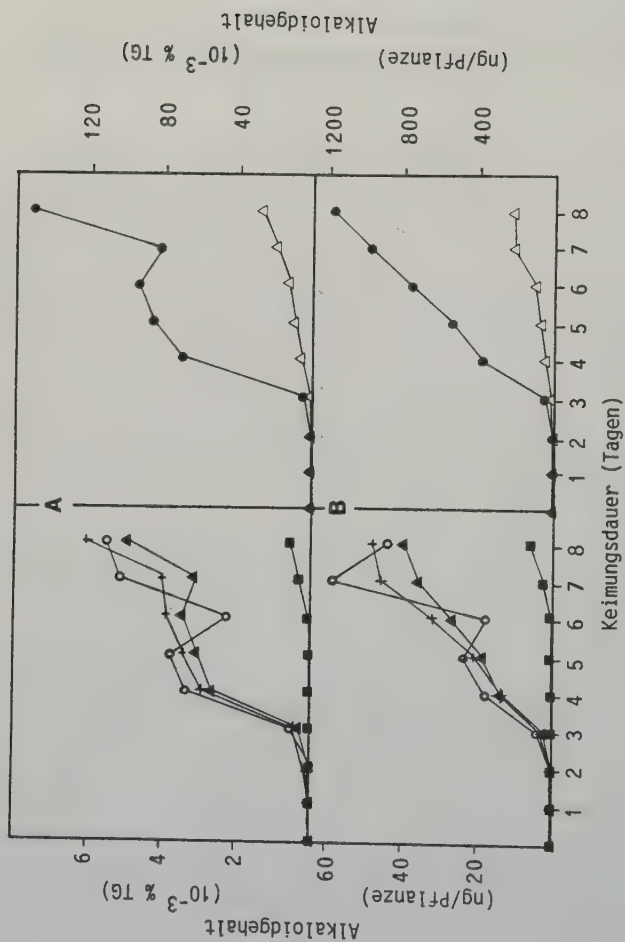


Abb. 43: Bildung von (S)-Retikulin (+), (R)-Retikulin (o), Salutaridin (▲), Thebain (●), Codein (Δ) und Morphin (■) während der ersten acht Tage der Keimung von Papaver somniferum-Samen. Unter A sind die Alkaloidgehalte in %, bezogen auf das Trockengewicht, unter B die Alkaloid-Mengen in ng pro Keimling, jeweils in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Keimungsbedingungen: vgl. Text.

Der Anstieg der Alkaloid-Mengen pro Keimling bedeutet nicht gleichzeitig eine Zunahme des Alkaloid-Gehaltes, da das Frischgewicht der Pflanzen ebenfalls während der Keimung ansteigt. Aus Abbildung 43 A kann jedoch abgelesen werden, daß auch der prozentuale Gehalt der sechs Opiumalkaloide am Trockengewicht der Keimlinge während der 8tägigen Versuchsdauer deutlich größer wird. Dies bedeutet, daß die Biosynthese der Alkaloide mit ansteigender Geschwindigkeit erfolgen muß. Nach 2-3 Tagen setzt die Zunahme des (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin- und Thebain-Gehaltes ein, nach 4-tägiger Keimung beginnt der Codein- und nach 7 Tagen der Morphin-Gehalt anzusteigen.

Den bei weitem höchsten Gehalt von den sechs radioimmunologisch bestimmbaren Alkaloiden weist Thebain auf. In etwa 10fach geringeren Mengen liegt Codein in den Keimlingen vor; etwa 20fach niedrigere Konzentrationen wurden für die biosynthetisch zuerst gebildeten Substanzen (S)- und (R)-Retikulin sowie Salutaridin ermittelt. Morphin liegt erst nach 7tägiger Keimung in nachweisbaren, aber sehr geringen Mengen vor.

Die geschilderten Ergebnisse könnte man so interpretieren, daß in den Keimlingen zunächst in erster Linie mit steigender Rate die Enzymsysteme gebildet oder aktiviert werden, die die Schritte der Morphin-Biosynthese bis zum Thebain (vgl. Abb. 2) katalysieren. Dadurch akkumuliert dieses Alkaloid und sein Gehalt nimmt zu. Erst nach vier Tagen treten die Enzyme auf, die Thebain zu Codein metabolisieren und mit einer weiteren Verzögerung von drei Tagen solche, die Codein zu Morphin demethylieren.

Nach 4tägiger Keimung war es möglich, die Keimpflanzen in Wurzel, Sproß und Blätter zu zerlegen, die Organe separat zu extrahieren und den Gehalt der sechs Opiumalkaloide in den drei Pflanzenteilen radioimmunologisch zu ermitteln. Abbildung 44 zeigt die zeitliche Abhängigkeit der Konzentra-

tionen von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain und Codein, jeweils in der Wurzel, im Sproß und in den Blättern. Morphin konnte in den einzelnen Pflanzenteilen nicht nachgewiesen werden. Sowohl von (S)- als auch von (R)-Retikulin sind die höchsten Gehalte in der Wurzel zu finden. Darüber hinaus erfolgt eine Zunahme der Gehalte in diesem Organ wesentlich schneller als im Sproß und in den Blättern (Abb. 44 A,B). Im Falle des Salutaridins (Abb. 44 C) sind die Unterschiede zwischen dem Gehalt der Wurzeln und des Sprosses weit weniger ausgeprägt. In den Blättern sind dagegen deutlich geringere Konzentrationen und Konzentrationsanstiege des Morphinandienons zu verzeichnen als in den beiden anderen Organen. Thebain liegt bis zum siebten Tag der Keimung in der Wurzel in wesentlich geringeren Mengen vor als im Sproß (Abb. 44 D). Erst am siebten und achten Tag erfolgt ein deutlicher Anstieg des Thebain-Gehaltes in der Wurzel, der dazu führt, daß die Wurzelkonzentration die des Sprosses übersteigt. Codein ist während der gesamten Untersuchungsdauer in höheren Mengen im Sproß als in der Wurzel vorhanden (Abb. 44 E). Ebenso wie der Thebain- steigt auch der Codein-Gehalt zwischen dem siebten und achten Tag der Keimung an, allerdings gleichermaßen im Sproß und in der Wurzel.

Aufgrund der dargelegten Befunde könnte man spekulieren, daß die Bildung von (S)- und (R)-Retikulin in erster Linie in der Wurzel stattfindet und daß die Alkaloide entweder nur in geringem Maße in die anderen Pflanzenteile transportiert oder hier gleich weiter metabolisiert werden. Die weitere Umsetzung zu Salutaridin, Thebain und Codein könnte ebenfalls in der Wurzel durchgeführt werden und die Produkte anschließend effektiver als die Benzylisochinoline - in die Sproßachse transportiert werden. Sie könnte aber ebenfalls, nach Transport des Retikulins in die Sproßachse, in diesem Organ erfolgen.

Das geschilderte Experiment demonstriert, daß mit Hilfe

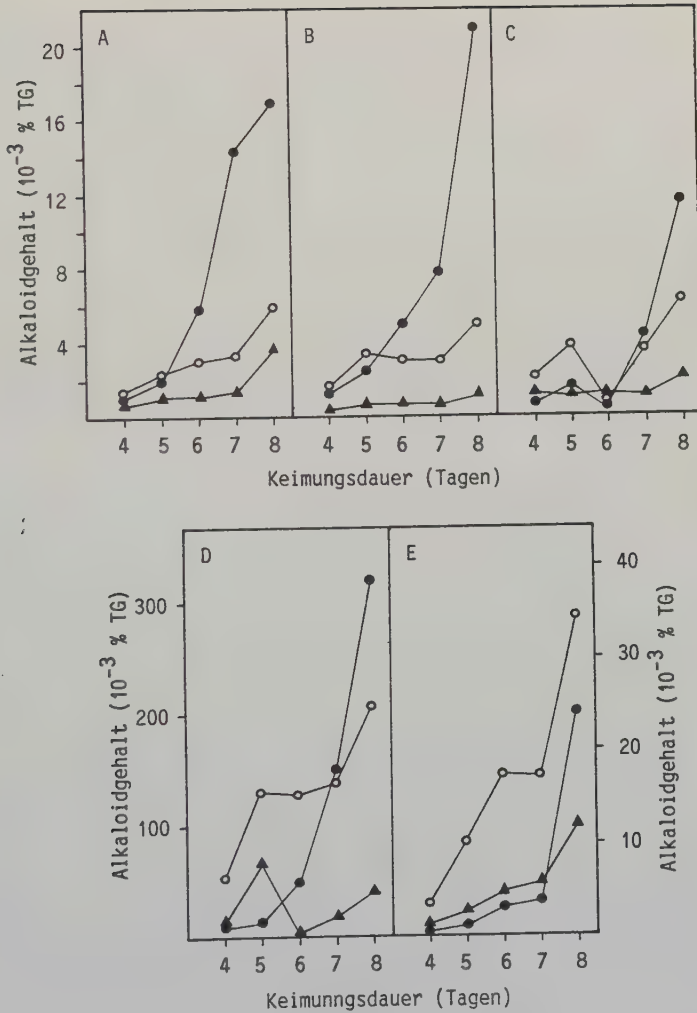


Abb. 44: (S)-Retikulin- (A), (R)-Retikulin- (B), Salutaridin- (C), Thebain- (D) und Codein-Gehalt (E) in Wurzeln (●), Sproßachsen (○) und Blättern (▲) von Papaver somniferum-Keimlingen in Abhängigkeit von der Keimungsdauer. Keimungsbedingungen: vgl. Text.

der in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntests die Bildung der in der Biosynthesesequenz des Morphins aufeinanderfolgenden Alkaloide (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin in Papaver somniferum-Keimlingen kinetisch verfolgt werden kann. Aus einer solchen Kinetik können günstige Zeitpunkte für weiterführende biosynthetische in vivo- und in vitro-Untersuchungen abgelesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch in einzelnen Organen der Keimlinge radioimmunologisch Alkaloid-Gehalte ermittelt und kinetisch verfolgt werden können. In weiterführenden Experimenten könnten auf diese Weise Erkenntnisse über die Bildung und den Transport der in der Biosynthese des Morphins auftretenden Zwischenstufen gewonnen werden.

7.5. Vorkommen von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin und Salutaridin in Herbarmaterial von Croton-Arten

Wie bereits eingangs erwähnt, kann der Bedarf an Morphinan-Alkaloiden bisher nicht rentabel über eine totalsynthetische Darstellung der Verbindungen gedeckt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß es noch nicht gelungen ist, die Oxidation von Retikulin zu Salutaridin mit genügend hoher Ausbeute durchzuführen. Die weitere Umsetzung des Morphinandienons Salutaridin zu Thebain, Codein und Morphin kann dagegen effizient mit chemischen Methoden durchgeführt werden (vgl. RICE und BROSSI, 1980). Um den Bedarf an den pharmazeutisch genutzten Alkaloiden Codein und Morphin zu decken, sollte deshalb nicht nur nach Papaver-Pflanzen gesucht werden, die Codein, Morphin oder Thebain produzieren, sondern auch nach solchem Pflanzenmaterial, aus dem Salutaridin in größerer Menge gewonnen werden kann. Die Isolierung von Salutaridin und seine chemische Umsetzung zu Codein und Morphin hätte gegenüber der direkten Gewinnung von Codein und Morphin den Vorteil, daß die mißbräuliche Verwendung der Morphinan-

Alkaloide einfacher kontrolliert und eingeschränkt werden könnte. Die Suche nach einer Salutaridin-reichen Pflanze ist insofern erfolgversprechend, als sie sich nicht auf einige Arten der Gattung Papaver beschränken müßte, da die Fähigkeit zur Biosynthese dieses Alkaloids im Pflanzenbereich weiter verbreitet ist (vgl. I).

Die Suche nach Salutaridin-haltigem Pflanzenmaterial stellt ein geeignetes Einsatzfeld für den in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntest zur Bestimmung des Morphinandienons dar. Da Salutaridin bereits in Croton salutaris (vgl. BARTON et al., 1965b; BARNES und SOEIRO, 1981), Croton balsamifera (CHAMBERS et al., 1966) sowie Croton plumieri (STUART und WOO-MING, 1969) nachgewiesen werden konnte, bot es sich an, weitere Arten der zur Familie der Euphorbiaceen gehörenden Gattung Croton mit Hilfe des Radioimmuntests zu untersuchen. Allerdings stand frisches Pflanzenmaterial der hauptsächlich in den Tropen beheimateten Croton-Arten nicht zur Verfügung. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des radioimmunologischen Analysenverfahrens war es jedoch möglich, für die Untersuchung kleinste Proben (vgl. II.1.2.) herbarisierter Pflanzen heranzuziehen, die im Herbar der Ludwig-Maximilians-Universität München vorhanden waren.

Blattproben von 44 Croton-Arten wurden, wie unter II.1.3. beschrieben, extrahiert und ihr Salutaridin-Gehalt radioimmunologisch ermittelt. Die Nachweisgrenze für das Alkaloid betrug unter den verwendeten Bedingungen 1×10^{-4} % des Trockengewichts. Daneben wurde der (S)- und (R)-Retikulin-Gehalt der Proben mit Hilfe der für (S)- und (R)-Retikulin spezifischen Radioimmuntests bestimmt, da diese Alkaloide biosynthetische Vorstufen von Salutaridin darstellen. Hier betrugen die Nachweisgrenzen 2×10^{-5} % (S)-Retikulin und 7×10^{-5} % (R)-Retikulin, jeweils bezogen auf das Trockengewicht. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 15 wiedergegeben.

Croton-Art	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung	Bezeichnung des Herbarbogens	Alkaloidgehalt (10^{-3} % des Trockengewichts) (S)-Ret. (R)-Ret.	Saluta- ridin
adamantinus	Brasilien	1972	Harley 15239	1,0	0
alienus	Kenia	1973	Grant	1,0	0
andinus	Bolivien	1897	Bang 1929	0,15	0
angustatus	West-Indien	1910	von Türckheim 2891	1,7	6,4
arechavaletae	Uruguay	1929	Herter 5054	4,7	0,32
argyranthemus	Texas		Jons 109	1,8	0,43
argyratus	Thailand	1972	Larsen 30954	1,4	0
	Borneo	1926	Elmer 21201	0	0
astroides	West-Indien	1900	Eggers 227	0	0
aubrevillei	Liberien	1960	Arnshoff 161	0	0
balsamifera	Florida	1900	Curtiss 2520	1,4	0,18
betulinus	West-Indien	1910	Fuertes 698	0	0
bonplandianus	Uruguay	1923	Herter 494	2,5	1,9
	Südafrika	1963	Strey 4820	2,0	2,1
brasiliensis	Brasilien	1975	Pereira 9597	1,7	0,26
					0,11

Fortsetzung Tab. 15

Croton-Art	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung	Bezeichnung des Herbarbogens	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (S)-Ret.	(R)-Ret.	Saluta- ridin
californicus	Kalifornien	1976	Moldenke 30808	0	0	0
campestris	Brasilien	1974	Harley 15522	17	4,7	1000
cassinoides	Madagaskar	1880	Hilldebrandt 3345	0,83	0,28	0
candatus	Indochina	1932	Squires	0	0	0
cuneatus	Venezuela	1979	Oberwinkler 15409	6,2	3,5	0,29
delpeyi	China	1933	Wang 34386	0,13	0	0
dichogamum	Äthiopien	1970	de Wilde 6443	1,8	0,13	0,15
dioicus	Mexiko	1927	Reiche 861	8,8	0,94	0,87
discolor	West-Indien	1910	von Türckheim 2772	15	4,5	2,5
drago	Mexiko	1954	Troll 306	7,6	0,30	0,46
echinocarpus	Brasilien	1972	Anderson 36055	14	0,34	0,32
eluteria	Guatemala	1892	Smith 2616	1,4	0,26	0,14
fergusonii	Florida	1940	Meebold 27990	5,1	1,1	1,4
ferruginellus	Brasilien	1914	Lützelburg 202	4,0	1,6	40
flavens	West-Indien	1959	Cowen 1586	1,1	1,2	0,38

Fortsetzung Tab. 15

Croton-Art	Herkunft	Jahr der Herbari- sierung	Bezeichnung des Herbarbogens	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des Trockengewichts) (S)-Ret. (R)-Ret.	Saluta- ridin	
floribundus	Brasilien	1920	Lützelburg 12468	0	0,55	0
gratissimus	Südafrika	1973	Smith 323	0,42	0,26	0
reflexifolius	Mexiko	1954	Troll 253	0,15	0	0
repens	Mexiko	1893	Pringle 4426	0,42	0,18	0
rhamnifolius	Venezuela	1964	Breteler 3257	1,6	1,6	0,63
ruizianus	Peru	1964	Hutchison u. Wright 3449	37	1,7	640
sagraeanus	West-Indien	1904	Curtiss 366	2,1	1,3	1,9
salutaris	Brasilien		F.C. Höhne s/n	0	0	0
schultesii	Brasilien	1974	Harley 16064	0	0	0
sellowii	Brasilien	1974	Harley 17071	0	0	0
spiralis	West-Indien	1887	Eggers 2360	0	0	0
splendidus	Brasilien	1936	Smith u. Klein 8513	1,0	0,19	0
texensis	Texas	1934	Fisher	0,12	0	0
trinitatis	Venezuela	1964	Breteler 3946	0	0	0

Aus der Tabelle geht hervor, daß 18 der 44 getesteten Pflanzen Salutaridin enthielten. In allen Fällen war das Auftreten von Salutaridin verbunden mit dem Vorkommen der biosynthetischen Vorstufen des Morphinandienons, (S)- und (R)-Retikulin. In 8 Pflanzen konnten nur die beiden Isomere des Retikulins, aber kein Salutaridin nachgewiesen werden. Man müßte weitergehend untersuchen, ob nicht auch diese Croton-Arten in der Lage sind, Salutaridin zu produzieren und ob nicht nur die analysierten Exemplare oder sogar nur die jeweils analysierten Pflanzenteile das Alkaloid nicht aufwiesen. In 7 Pflanzen trat nur das (S)-Enantiomer, in einer Pflanze nur das (R)-Enantiomer auf. 11 Pflanzen enthielten keines der drei Alkaloide.

Den höchsten Salutaridin-Gehalt von annähernd 1 % des Trockengewichts wies ein Exemplar von Croton campestris auf, das in Brasilien gesammelt worden war. Daneben konnte für eine Croton ruizianus-Pflanze, die aus Peru stammte, eine ebenfalls hohe Salutaridin-Konzentration von 0,64 % ermittelt werden. Alle anderen Salutaridin-haltigen Pflanzen zeigten deutlich geringere Alkaloidgehalte, oft weniger als 1×10^{-3} % des Trockengewichts.

Die für die Herbarpflanzen ermittelten Alkaloid-Konzentrationen dürfen sicherlich nicht auf das frische Pflanzenmaterial übertragen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der in den frischen Pflanzen vorhandenen Substanzmengen bei der Herbarisierung verloren geht. Die Analyse von Herbarmaterial kann jedoch zeigen, welche Pflanzenarten prinzipiell zur Biosynthese des Alkaloids befähigt sind.

Tab. 15: (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin- und Salutaridin-Gehalt von Herbarpflanzen der Gattung Croton (Euphorbiaceae). Ein Gehalt von 0 % bedeutet, daß der tatsächliche Gehalt unterhalb der im Text angegebenen Nachweisgrenzen liegt.

Bemerkenswert ist, daß selbst in sehr altem Material, das bereits am Ende des letzten Jahrhunderts gesammelt wurde, Salutaridin oder Retikulin mit Hilfe der Radioimmuntests noch nachweisbar ist. Darüber hinaus können die Ergebnisse Anhaltspunkte liefern, bei welcher Art weitere Selektionsuntersuchungen lohnenswert wären, um hochproduzierende Pflanzen zu erhalten.

Die in Tabelle 15 dargestellten Befunde zeigen eindeutig, daß die Fähigkeit zur Biosynthese von Salutaridin in der Gattung Croton weiter verbreitet ist, als bislang festgestellt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur wenige der insgesamt verfügbaren Pflanzen analysiert, um die generelle Anwendbarkeit des radioimmunologischen Analysenverfahrens für solche Untersuchungen zu demonstrieren. Die hier ausgeführten Ergebnisse legen jedoch nahe, daß bei weiteren Analysen eine gute Möglichkeit besteht, in der Gattung Croton, von der etwa 700 Arten beschrieben sind (ENGLER, 1964), Pflanzen zu finden, die besonders hohe Salutaridin-Gehalte aufweisen. Bei solchen Untersuchungen sollten jedoch stets mehrere Herkünfte einer Art getestet werden, da die Bildung des Alkaloids auch von äußeren Faktoren abhängen kann. Dies zeigt sich darin, daß die hier untersuchten Croton salutaris- und Croton balsamifera-Exemplare kein Salutaridin enthielten, daß aber die zuvor zitierten früheren Untersuchungen gezeigt haben, daß diese Arten die Fähigkeit zur Synthese des Alkaloids besitzen. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß die hier getesteten Pflanzen nicht richtig bestimmt worden sind und eine falsche taxonomische Bezeichnung tragen.

8. Untersuchungen zum Vorkommen der Opiumalkaloide
in pflanzlichen Zellkulturen

8.1. Bestimmung von (S)- und (R)-Retikulin in Kallus-
kulturen verschiedener Pflanzen

Retikulin hat sich aufgrund von Fütterungsexperimenten als biosynthetische Vorstufe zahlreicher Isochinolinalkaloide erwiesen (vgl. CORDELL, 1981). Wie bereits eingangs erwähnt (vgl. I) stellt es beispielsweise den Ausgangspunkt für die Bildung der Morphinane dar (BARTON et al., 1963; BATTERSBY et al., 1963). Aber auch bei der Entstehung der Protoberberine und davon abgeleiteter Alkaloidtypen (z. B. Phthalid-isochinoline, Protopine, Benzophenanthridine) spielt dieses Benzyloisochinolin eine Schlüsselrolle (vgl. CORDELL, 1981).

Ein zentrales Problem bei den Untersuchungen der von Retikulin abgeleiteten Alkaloidtypen besteht darin, nachzuweisen, welches der zwei Stereoisomeren des Retikulins die unmittelbare biosynthetische Vorstufe darstellt. Dies kann mit Hilfe von Fütterungsexperimenten nicht immer eindeutig entschieden werden, da in vivo stets die Möglichkeit besteht, daß die beiden Enantiomeren ineinander überführt werden (BATTERSBY et al., 1965b; vgl. Abb. 2). Ein schlüssiges Ergebnis können dagegen Versuche erbringen, bei denen auf zellfreier Ebene die Spezifität der isolierten Enzymsysteme, die die einzelnen Biosynthesereaktionen katalysieren, gegenüber den Stereoisomeren ermittelt wird.

In unserer Arbeitsgruppe werden solche in vitro-Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die an der Biosynthese des Berberins beteiligten Enzyme nachzuweisen und zu charakterisieren. So konnte z. B. von STEFFENS et al. (1984) gezeigt werden, daß das sogenannte Berberinbrückenzym, das Retikulin unter der Bildung der Berberinbrücke zu Scoulerin oxidiert, nur das (S)-Enantiomer des Benzyloisochinolins umsetzen kann. AMANN et al. (1984) wiesen nach, daß die Oxi-

dation der Tetrahydroprotoberberinalkaloide zu den Protoberberinen ebenfalls stereospezifisch mit dem (S)-Enantiomer erfolgt. Bei beiden Arbeiten erwiesen sich pflanzliche Zellkulturen, die die Kapazität zur Synthese der entsprechenden Alkaloide besitzen, als besonders geeignetes Untersuchungsmaterial (HINZ und ZENK, 1981).

Mit Hilfe der stereospezifischen Radioimmuntests für die zwei Retikulin-Enantiomeren bot sich eine einfache Möglichkeit, eine Anzahl der in der Zellkultursammlung des Lehrstuhls vorhandenen Kalluskulturen hinsichtlich ihres (S)- und (R)-Retikulin-Gehalts zu charakterisieren; hieraus sollten sich Anhaltspunkte darüber ergeben, welche Kultur ein Versuchsobjekt darstellen könnte für weitergehende stereochemische Untersuchungen zur Biosynthese des Berberins und anderer Alkaloide. Insgesamt wurden, abgesehen von den Kontrollen, 92 Zellkulturen getestet; sie sind vier Familien zuzuordnen, die durch das Auftreten von Benzyloisochinolin- und Protoberberinalkaloiden gekennzeichnet sind (JEFFS, 1967; SEIGLER, 1977). Es wurden z. T. von einer Pflanzenart mehrere Kulturen untersucht, die sich im Ausgangsmaterial, aus dem der Kallus angelegt worden war, unterschieden.

Die Zellkulturen wurden drei Wochen nach der Überführung auf frisches Medium mit 80 % Methanol extrahiert, wie unter II.2.7. beschrieben. Das Ergebnis der radioimmunologischen (S)- und (R)-Retikulin Messung der Extrakte zeigt Tabelle 16.

Aus ihr geht hervor, daß die Fähigkeit zur Biosynthese des Retikulins in den analysierten Kalluskulturen sehr verbreitet ist, da in 78 von 94 Extrakten Retikulin nachgewiesen werden konnte. Den maximalen (S)-Retikulin-Gehalt aller Kulturen wies mit 0,327 % des Trockengewichts ein Papaver orientale-Kallusgewebe der Herkunft Sofia auf. Die höchste (R)-Retikulin-Konzentration wurde bei einer Berberis stolonifera-Kultur gemessen; sie betrug 0,040 % des Trockengewichts.

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10-3 % TG) (S)- (R)-	
Berberidaceae:				
Berberis amurensis Rupr.	Genf	LS	13	22
Berberis amurensis Rupr.	Genf	LS	11	24
Berberis aristata DC.	Warschau	LS	25	5,0
Berberis aristata DC.	Warschau	LS	4,9	3,7
Berberis beaniana Schneid.	Genf	LS	14	27
Berberis beaniana Schneid.	Genf	LS	6,0	8,0
Berberis dasystachia Maxim.	Wageningen	LS	13	2,3
Berberis gagnepainii Schneid.	Rotterdam	LS	7,6	15
Berberis henryana Schneid.	Vacratot	LS	27	5,5
Berberis heteropoda Schrenk.	Warschau	LS	1,2	0,4
Berberis julianae Schneid.	Wien	LS	2,4	2,4
Berberis notabilis Schneid.	Warschau	LS	7,6	5,6
Berberis nummularia		LS	22	7,8
Berberis papillifera		LS	1,7	1,2
Berberis regeliana Koehne	Straßburg	LS	< NWG	1,4
Berberis sherriffii	Wisley	LS	0,6	0,6
Berberis stolonifera Koehne & Wolf		LS	14	40
Berberis stolonifera Koehne & Wolf		LS	5,4	7,9

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
<i>Berberis taliensis</i>	Amsterdam	LS	4,2	6,0
<i>Berberis wilsoniae</i> Hemsl. et Wils.	Wageningen	LS	12	12
<i>Berberis wilsoniae</i> Hemsl. et Wils.	Wuppertal	LS	81	15
<i>Podophyllum emodi</i> Wall.	Göttingen	LS	<NWG	<NWG
<i>Podophyllum hexandrum</i> Royle	Oslo	LS	0,2	0,1
<i>Podophyllum peltatum</i> L.	Erlangen	LS	<NWG	<NWG
Fumariaceae:				
<i>Adlumia fungosa</i> (Ait.) Greene	Karlsruhe	LS	<NWG	0,1
<i>Adlumia fungosa</i> (Ait.) Greene	Karlsruhe	LS	4,7	5,6
<i>Adlumia fungosa</i> (Ait.) Greene	Philadelphia	LS	0,8	1,6
<i>Corydalis aurea</i> Willd.	Vancouver	LS	0,6	0,1
<i>Corydalis glauca</i> (Curt.) Pursh.		LS	1,4	0,4
<i>Corydalis glauca</i> (Curt.) Pursh		LS	1,2	1,1
<i>Corydalis ophiocarpa</i> Hook. f. et Thoms.	Göttingen	LS	41	0,7
<i>Corydalis ophiocarpa</i> Hook. f. et Thoms.	Dublin	LS	16	0,4
<i>Corydalis ophiocarpa</i> Hook. f. et Thoms.		LS	3,2	0,3
<i>Corydalis pallida</i> Pers.	Mühlhausen	LS	<NWG	<NWG
<i>Corydalis sempervirens</i> (L.) Pers.	London	LS	<NWG	0,3
<i>Corydalis sempervirens</i> (L.) Pers.	London	LS	2,3	0,5

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
Corydalis vaginans Royle	Göttingen	LS	< NWG	0,4
Corydalis vaginans Royle	Uppsala	LS	0,7	0,1
Corydalis vaginans Royle		LS	< NWG	0,1
Dicentra canadensis (Goldie)Walp.		LS	0,4	0,1
Dicentra spectabilis (L.) Lem.		LS	7,1	1,0
Dicentra spectabilis (L.) Lem.		LS	0,7	0,5
Fumaria capreolata L.		LS	11	1,9
Fumaria muralis Sond. ex Koch	Hauniens	LS	< NWG	< NWG
Fumaria muralis Sond. ex Koch		LS	< NWG	< NWG
Papaveraceae:				
Argemone alba Lestib.	Münster	LS	1,3	0,4
Argemone alba Lestib.	Karlsruhe	LS	0,8	0,4
Argemone intermedia Sweet.	Kosice	LS	1,3	< NWG
Argemone mexicana L.	Coimbra	LS	3,3	3,0
Argemone mexicana L.	Wuppertal	LS	< NWG	< NWG
Argemone ochroleuca Sweet.	Braunschweig	LS	18	0,9
Argemone platyceras Link et Otto	Mühlhausen	LS	12	1,3
Argemone polyanthemus (Fedde) Ownbey		LS	37	1,6
Bocconia cordata Will.	Cluj-Napoca	LS	0,4	0,3

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
<i>Chelidonium majus</i> L.		LS	3,8	0,4
<i>Cysticapnos vesicarius</i> (L.) Fedde	Uppsala	LS	4,2	2,7
<i>Cysticapnos vesicarius</i> (L.) Fedde	Marburg	LS	2,4	0,7
<i>Eschscholtzia douglasii</i> Hook. et Arn.		LS	15	1,4
<i>Eschscholtzia lobbii</i> Greene		LS	0,6	0,4
<i>Eschscholtzia pulchella</i>		LS	< NWG	0,3
<i>Eschscholtzia tenuifolia</i> Hook. f.		LS	0,5	1,2
<i>Glaucium corniculatum</i> (L.) Curt.	Karlsruhe	LS	2,4	0,7
<i>Glaucium flavum</i> Crantz.	Wien	LS	10	2,2
<i>Glaucium rubrum</i> Sibth et Sm.		LS	4,0	0,5
<i>Hypecoum pendulum</i> L.	Mainz	LS	0,3	0,1
<i>Hypecoum pendulum</i> L.	Mainz	LS	0,5	0,1
<i>Papaver apokrinomenon</i> Fedde	Rumänien	LS	1,1	< NWG
<i>Papaver argemone</i> L.	Kerkrade	LS	2,0	0,1
<i>Papaver atlanticum</i> (Ball) Coss.	Nijmegen	LS	1,8	0,1
<i>Papaver atlanticum</i> (Ball) Coss.	Sofia	LS	36	0,2
<i>Papaver bracteatum</i> Lindl.		LS	193	1,7
<i>Papaver bracteatum</i> Lindl.		LS	126	11
<i>Papaver bracteatum</i> Lindl.	Nijmegen	LS	89	0,4

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
Papaver bracteatum Lindl.	Potsdam	LS	97	0,7
Papaver californicum A. Gray	Berlin	LS	3,1	< NWG
Papaver caucasicum Bieb.	Berlin	LS	0,7	0,1
Papaver croceum Ledeb.	Moskau	LS	16	0,4
Papaver feddei O. Schwarz	London	LS	7,7	0,2
Papaver orientale L.		LS	170	0,4
Papaver orientale L.		LS	141	1,3
Papaver orientale L.		LS	128	0,6
Papaver orientale L.		LS	168	0,6
Papaver orientale L.		LS	160	0,5
Papaver orientale L.	Cluj-Napoca	LS	229	2,0
Papaver orientale L.	Sofia	LS	121	1,2
Papaver orientale L.	Sofia	LS	327	2,2
Papaver orientale L.	Sofia	LS	81	0,2
Papaver orientale L.	Sofia	LS	101	0,8
Papaver orientale L.	Sofia	LS	69	0,2
Papaver pseudocanescens Pop.	Bukarest	LS	4,2	0,3
Papaver rhaeticum Leresche ex Gremli	Halle	LS	0,2	< NWG

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Moskau	LS	< NWG	< NWG
<i>Papaver rupifragum</i> Boiss. & Reut.	Besancon	LS	0,5	< NWG
<i>Papaver rupifragum</i> Boiss. & Reut.		LS	1,1	0,1
<i>Papaver sendtneri</i> Kerner ex Hayek	Halle	LS	< NWG	< NWG
<i>Papaver somniferum</i> L.	Budapest	LS	0,4	1,1
<i>Papaver strictum</i> Boiss. & Bal. ex Boiss.		LS	3,0	0,3
<i>Papaver triniifolium</i> Boiss.	Limoges	LS	1,4	0,1
Ranunculaceae:				
<i>Aquilegia canadensis</i> L.	Göttingen	LS	< NWG	< NWG
<i>Aquilegia chrysantha</i> A. Gray	Istanbul	LS	< NWG	< NWG
<i>Aquilegia formosa</i> Fisch.	Budapest	LS	0,5	0,3
<i>Aquilegia grandiflora</i>		LS	145	1,1
<i>Aquilegia longissima</i> A. Gray ex S. Wats.	Karlsruhe	LS	< NWG	< NWG
<i>Aquilegia skinneri</i> Hook.	Berlin	LS	< NWG	< NWG
<i>Ranunculus lanuginosus</i> L.	Bochum	LS	< NWG	< NWG
<i>Thalictrum calabricum</i> Spreng.	Bukarest	LS	0,7	0,1
<i>Thalictrum coerulum</i>	Jelitto	LS	3,1	0,6
<i>Thalictrum dasycarpum</i> Fisch. et Lall.	Leipzig	LS	1,0	0,1
<i>Thalictrum dipterocarpum</i> Franch.	Jelitto	4x	3,8	0,7

Fortsetzung Tab. 16

Zellkultur	Herkunft	Medium	Retikulin-Gehalt (10 ⁻³ % TG)	
			(S)-	(R)-
<i>Thalictrum galioides</i> Nestl.	Wien	LS	0,4	< NWG
<i>Thalictrum glaucum</i> Desf.	Karlsruhe	LS	2,6	0,7
<i>Thalictrum minus</i> L.	Liverpool	LS	3,2	0,3
<i>Thalictrum minus</i> L.	Jelitto	4x	< NWG	< NWG
<i>Thalictrum squarrosum</i> Steph.	Berlin	LS	1,7	0,1
<i>Thalictrum tuberosum</i> L.	Wageningen	LS	1,4	0,1
<i>Thalictrum tuberosum</i> L.	Wageningen	4x	1,2	0,2
Kontrollen:				
Apocynaceae:				
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.		LS	< NWG	< NWG
Rosaceae:				
<i>Rosa canina</i> L.	Basel	LS	< NWG	< NWG

Tab. 16: Gehalt von (S)- und (R)-Retikulin in 94 Kalluskulturen von Pflanzen aus sechs verschiedenen Familien. Die Kulturen wurden drei Wochen nach Übertragung auf frisches Medium extrahiert, wie unter II.2.7. beschrieben. Als Herkunft ist jeweils angegeben, woher das Ausgangsmaterial zur Anlage der Kultur stammte. NWG = Nachweisgrenze ($< 0,1 \times 10^{-3}$ % TG).

In den meisten Geweben wurden beide Enantiomere gefunden; in 11 Kulturen war nur jeweils eines der zwei Stereoisomeren vertreten. Interessanterweise wiesen die Kalli, die kein (S)-Retikulin enthielten, auch nur geringe Mengen des

(R)-Enantiomers auf. Die Kulturen ohne (R)-Retikulin zeigten dagegen hohe (S)-Retikulin-Gehalte. Darüber hinaus war in fast allen Zellkulturen, die beide Enantiomere enthielten, die (S)-Retikulin-Menge bedeutend größer als die des (R)-Isomers. Diese zwei Befunde stehen in Übereinstimmung mit der in vitro-Untersuchung von RUEFFER et al. (1981), die gezeigt hat, daß Norlaudanosolin, das biosynthetisch zuerst gebildete Tetrahydrobenzylisochinolinalkaloid, stereoselektiv in der (S)-Konfiguration entsteht. Offensichtlich findet in den Zellkulturen praktisch keine Konfigurationsumkehr am C-Atom 1 auf der biosynthetischen Sequenz bis zum Retikulin statt. Ein Enzymsystem, das eine solche Racemisierung katalysiert, war von BATTERSBY et al. (1965b) in in vivo-Fütterungsexperimenten an differenzierten Papaver somniferum-Pflanzen nachgewiesen worden. Das Fehlen dieses Enzyms in Papaver-Zellkulturen, das durch die hier präsentierten Ergebnisse dokumentiert wird, könnte (mit)verantwortlich sein für die eingangs erwähnte (vgl. I) Unfähigkeit von Papaver somniferum-Zellkulturen, Morphinane zu produzieren.

Nur in insgesamt 8 Kallusgeweben übertraf das (R)-Enantiomer des Retikulins mengenmäßig das (S)-Enantiomer. Dies waren Kulturen sechs verschiedener Berberis-Arten und zwei Adlumia fungosa-Zellkulturen verschiedener Herkunft. Viele Berberis-Kulturen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Protoberberinen, insbesondere Jatrorrhizin, aus (HINZ und ZENK, 1981). Bei der Biosynthese dieser Alkaloide bildet (S)-Retikulin den Ausgangspunkt (BARTON et al., 1965a; RUEFFER et al., 1983). Darüber hinaus konnte STEFFENS (1984) sowohl in zahlreichen Berberis-Arten als auch in der Gewebekultur von Adlumia fungosa eine hohe Aktivität des Berberinbrückenzym nachweisen, das (S)-Retikulin zu Scoulerin oxidiert. Diese Befunde deuten darauf hin, daß ein Überschuß von (R)- gegenüber (S)-Retikulin auf der ausschließlichen Metabolisierung von (S)-Retikulin zu Protoberberinen oder anderen

Alkaloiden zurückzuführen ist und nicht auf eine gesteigerte Aktivität der Enzyme, die die Konfigurationsumkehr am C-Atom 1 des Retikulins katalysieren.

Durch einen besonders hohen Gehalt an (S)-Retikulin zeichneten sich alle elf verschiedenen getesteten Papaver orientale-Zellkulturen aus. Sie besaßen nur Spuren des (R)-Enantiomers. In diesen Kulturen scheinen die Retikulin metabolisierenden Enzyme eine geringe Aktivität zu besitzen; sie könnten sich deshalb als ein geeignetes Untersuchungsobjekt erweisen für zellfreie Experimente zur Retikulin-Biosynthese

Um zu untersuchen, wie die (S)-Retikulin-Konzentration in den einzelnen Zellaggregaten der Papaver orientale-Zellkultur variiert und ob eine Zelllinie mit erhöhtem (S)-Retikulin-Gehalt selektioniert werden kann, wurde eine Suspensionskultur der Herkunft Sofia ((S)-Retikulin-Gehalt des Kallusgewebes: 0,121 %) auf Festmedium plattiert und kultiviert (vgl. II.2.5.). Von 200 der heranwachsenden Zellkolonien wurde der (S)- und (R)-Retikulin-Gehalt ermittelt, nachdem Proben, wie unter II.2.7. beschrieben, aufgearbeitet worden waren. Die Häufigkeitsverteilung der (S)- und (R)-Retikulin-Konzentrationen ist in Abbildung 45 dargestellt.

Es zeigte sich, daß Zellkolonien mit einem (S)-Retikulin-Gehalt von 0,03 - 0,04 % mit der größten Häufigkeit, annähernd 20 %, auftraten. Nur wenige Zelllinien (<10 %) besaßen einen höheren Gehalt als die ursprüngliche Kalluskultur. Die maximale Konzentration einer Kolonie wurde zu 0,35 % bestimmt. Sie war damit nur etwa dreimal so hoch wie der (S)-Retikulin-Gehalt des Papaver orientale-Kallusgewebes, des Ausgangsmaterials für die Plattierung. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine Steigerung der (S)-Retikulin-Konzentration in Zellkulturen von Papaver orientale durch Selektion von einzelnen Zellkolonien nicht erfolversprechend.

Der Gehalt des (R)-Enantiomers lag in allen untersuchten

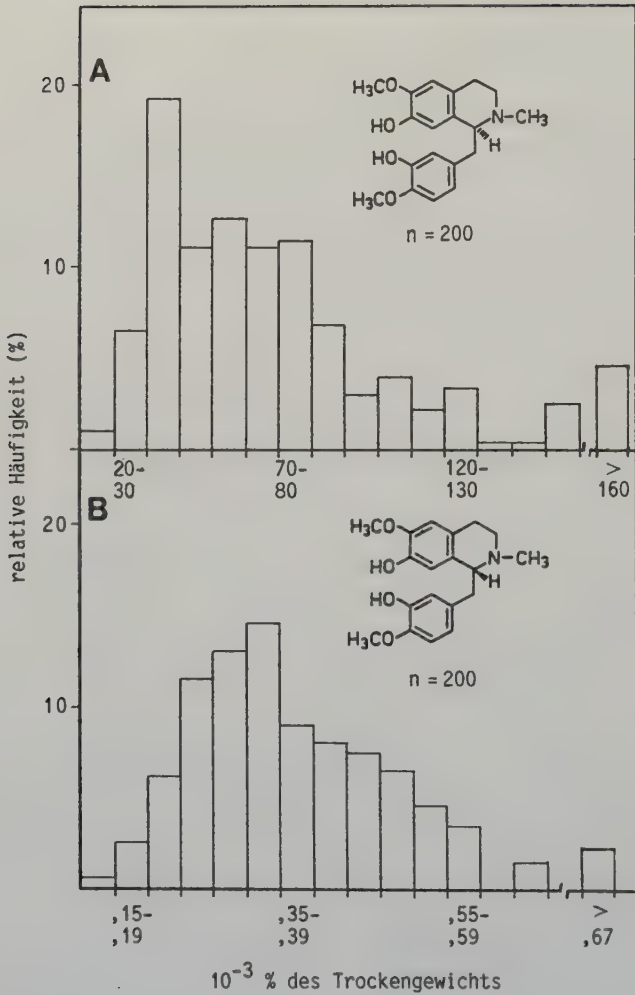


Abb. 45: Häufigkeitsverteilung des (S)-Retikulins- (A) und (R)-Retikulins-Gehaltes (B) in 200 Zellkolonien von Papaver orientale (Herkunft: Sofia; vgl. Tab. 16).

Zellaggregaten signifikant unter dem des (S)-Isomers, wie es bereits für die Kalluskultur ermittelt worden war. Der höchste (R)-Retikulin-Gehalt betrug $2 \times 10^{-3} \%$; mehr als 90 % aller untersuchten Kolonien wiesen eine (R)-Retikulin-Konzentration auf, die geringer als $0,5 \times 10^{-3} \%$ war.

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß die Übersicht über die (S)- und (R)-Retikulin-Gehalte der 94 Kalluskulturen lediglich Anhaltspunkte liefern kann, welches Gewebe als Untersuchungsmaterial für weitergehende in vivo- und in vitro-Experimente zur Biosynthese der Isochinolin-Alkaloide geeignet ist. Schlußfolgerungen, die Aktivitäten bestimmter Enzyme oder die Befähigung zur Bildung von verschiedenen Alkaloidtypen betreffend, lassen sich aus den angeführten radioimmunologischen Bestimmungen allein nicht ziehen. Die Hoffnung, ein Gewebe zu finden, mit dem fermentativ (S)- oder (R)-Retikulin in größeren Mengen gewonnen werden könnte, haben sich ebenfalls nicht erfüllt.

8.2. Untersuchungen zur Produktion von Morphinan-Alkaloiden in pflanzlichen Zellkulturen von Papaver

Wie bereits eingangs erwähnt (vgl. I), stellen Papaver-Pflanzen bei ihrer Überführung in Zellkulturen fast immer die Bildung der Morphinan-Alkaloide ein. Aufgrund der Totipotenz der Pflanzenzellen (REINERT, 1958; STEWARD et al., 1958) ist anzunehmen, daß die Information zur Biosynthese dieser Alkaloide auch in den entdifferenzierten Geweben vorhanden sein muß; sie kann möglicherweise jedoch unter den in der Zellkultur vorliegenden Wachstumsbedingungen nicht ausgeprägt werden. Mit Hilfe der Radioimmuntests für die Bestimmung von Thebain, Codein und Morphin bot sich jedoch erstmals die Möglichkeit, in einem umfangreichen Versuchsprogramm zu studieren, welchen Einfluß die Variation von Pflanzenmaterial und Kultivierungsbedingungen auf die Produktion der Morphinane

hat, um eine Zellkultur zu erhalten, die zur Bildung dieser Alkaloide befähigt ist.

8.2.1. Bestimmung von Thebain, Codein und Morphin in Kalluskulturen von Papaver

Um Untersuchungsmaterial für das Screening-Experiment zur Verfügung zu haben, wurden im Rahmen dieser Arbeit 124 Zellkulturen von Papaver somniferum verschiedener geographischer Herkünfte neu etabliert. Hierzu dienten als Ausgangsmaterial Samenproben, die von Botanischen Gärten aus aller Welt erbeten worden waren (vgl. II.1.1.). Die Anlage der Kulturen erfolgte wie unter II.2.4. beschrieben. Daneben standen aus der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie 9 weitere Papaver somniferum-Kallusgewebe sowie Zellstämme diverser Papaver-Arten zur Verfügung, und zwar von P. aculeatum (2 Stämme), P. alboroseum (1), P. argemone (1), P. atlanticum (1), P. bracteatum (5), P. californicum (1), P. caucasicum (4), P. dubium (3), P. feddei (1), P. glaucum (1), P. heldreichii (1), P. kernerii (1), P. macrostomum (1), P. monanthum (1), P. nudicaule (2), P. orientale (13), P. pinnatifidum (2), P. pyrenaicum (2), P. radiculatum (1), P. rhoeas (5), P. rupifragum (1), P. schinzianum (2), P. setigerum (1) und P. tauricola (1). Proben aller Kulturen wurden extrahiert, wie unter II.2.7. angegeben, und der Extrakt mit Hilfe der Radioimmuntests für Thebain, Codein und Morphin analysiert. Obwohl mit den Testsystemen in den Kallusgeweben ein Alkaloidgehalt von etwa $1 \times 10^{-5} \%$, bezogen auf das Trockengewicht, noch nachweisbar gewesen wäre, wurden nur in einer Kultur Spuren der Morphinan-Alkaloide gefunden. Bei diesem Kallus handelte es sich um einen Stamm von Papaver somniferum mit der internen Bezeichnung P049. Er enthielt $1 \times 10^{-3} \%$ Thebain, $1,5 \times 10^{-5} \%$ Codein und $2 \times 10^{-5} \%$ Morphin (jeweils bezogen auf das Trockengewicht). Die Codein- und Morphin-Gehalte la-

gen wenig über der Nachweisgrenze der Radioimmuntests, der Thebain-Gehalt war deutlich höher. Ein Photo der Kalluskultur zeigt Abbildung 46.

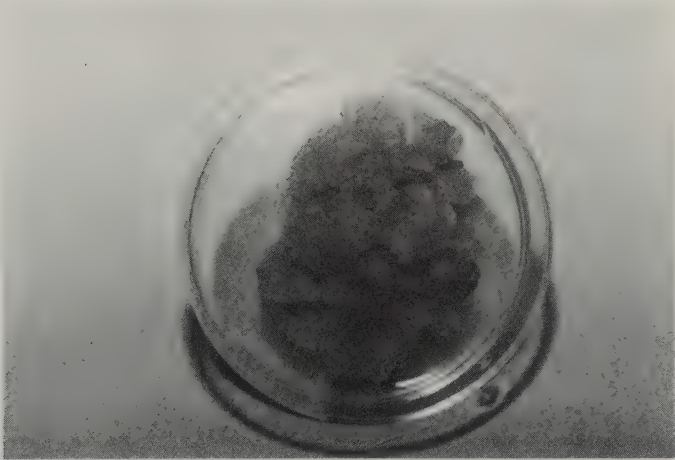
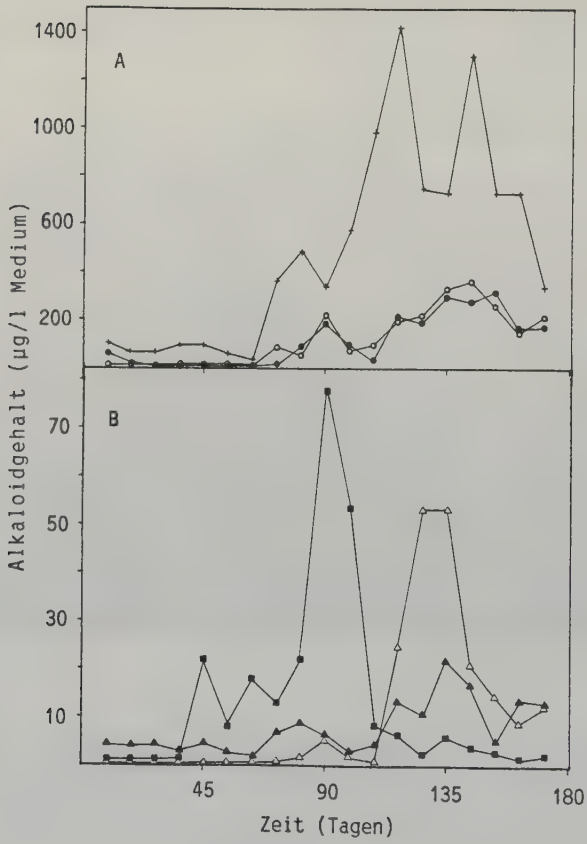


Abb. 46: Kalluskultur Papaver somniferum/P049 mit der Fähigkeit zur Bildung der Morphinan-Alkaloide.

Das Morphinan-produzierende Kallusgewebe wurde in eine Suspensionskultur überführt (vgl. II.2.5.), die in 300 ml Erlenmeyerkolben in 9tägigen Abständen subkultiviert wurde. Über einen Zeitraum von sechs Monaten wurden bei jedem Überimpfen aliquote Teile des Suspensionsgewebes extrahiert (vgl. II.2.7.) und der Gehalt der sechs radioimmunologisch erfaßbaren Opium-Alkaloide ermittelt. Die Alkaloidgehalte sind in Abhängigkeit von der Zeit in Abbildung 47 dargestellt.



Hieraus ist ersichtlich, daß die sechs Opium-Alkaloide in der Suspensionskultur während des gesamten Zeitraums der Untersuchung nachgewiesen werden konnten. Die Mengen aller Alkaloide waren nach Überführung der Kultur vom Fest- ins Flüssigmedium zunächst niedrig; sie stiegen jedoch nach einigen Subkultivierungen in mehr oder weniger starkem Maße an. (S)-Retikulin stellt jenes Alkaloid dar, das in der höchsten Konzentration in der Kultur auftritt. Ebenso wie in den Kaluskulturen anderer Pflanzen (vgl. III.8.1.) liegt auch in der Suspensionskultur von Papaver somniferum/P049 das (R)-Enantiomer in weitaus geringerer Menge vor. Dies legt die Vermutung nahe, daß in der Suspensionskultur die Umwandlung von (S)- zu (R)-Retikulin einen limitierenden Schritt für die Bildung der Morphinan-Alkaloide darstellt. In etwa ebenso großen Konzentrationen wie (R)-Retikulin tritt Thebain auf; es übertrifft mengenmäßig sowohl Codein als auch Morphin. Dies könnte bedeuten, daß die Demethylierung von Thebain zu Codein und Morphin eine weitere Limitierung der Biosynthese des Morphins in der Kultur bildet.

8.2.2. Untersuchungen zur Steigerung des Thebain-Gehaltes einer Suspensionskultur von Papaver somniferum

Wie der zuvor geschilderte Versuch zeigt, stand mit Papaver somniferum/P049 eine Suspensionskultur zur Verfügung,

Abb. 47: (S)-Retikulin- (+,A), (R)-Retikulin- (o,A), Salutaridin- (▲,B), Thebain- (●,A), Codein- (△,B) und Morphin-Gehalt (■,B) einer Suspensionskultur von Papaver somniferum/P049 in Abhängigkeit von der Zeitdauer, die das Gewebe in Suspension kultiviert wurde. Die Kultur wurde in 9tägigen Abständen subkultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde jeweils ein aliquotes Teil des Gewebes extrahiert, wie unter II.2.7. beschrieben, und der Alkaloidgehalt der Extrakte radioimmunologisch untersucht.

die sich durch eine kontinuierliche Produktion der Morphinan-Alkaloide auszeichnete. Die Alkaloid-Mengen, die aus der Kultur gewonnen werden konnten, waren jedoch mit maximal 320 µg Thebain, 53 µg Codein und 77 µg Morphin pro Liter Medium sehr gering. Deshalb sollte in folgenden Experimenten untersucht werden, ob durch eine Variation unterschiedlicher Kultivierungsparameter eine Steigerung der Alkaloid-Produktion erzielt werden könnte. Da Thebain in der Suspensionskultur in signifikant höheren Konzentrationen auftrat als Codein und Morphin, wurde anhand dieses Inhaltsstoffes der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Produktion der Morphinan-Alkaloide studiert.

8.2.2.1. Einfluß unterschiedlicher Medien

In einem ersten Schritt sollten 11 Medien (vgl. II.2.2.) mit insgesamt 29 unterschiedlichen Hormon-, Zucker- und NZ-Amin-Kombinationen getestet werden. Hierzu wurde Gewebe, das in LS-Medium (vgl. II.2.2.) angezogen worden war, in die in Tabelle 17 aufgeführten Medien übertragen und kultiviert, wie unter II.2.5. beschrieben. Die Versuchskulturen wurden anschließend aufgearbeitet (vgl. II.2.7.) und analysiert, indem jeweils der Thebain-Gehalt des Gewebes und des Mediums sowie das Wachstum der Kultur bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 48 dargestellt.

Von den 29 untersuchten Medien erwiesen sich 11 als völlig untauglich für die Anzucht der Kultur, weil sich die Zellen in diesen Medien nur in geringem Maße oder gar nicht vermehrten. In den übrigen 18 Medien wurde ein mehr oder weniger gutes Wachstum registriert. Dies war jedoch nur in fünf Fällen mit einer Thebain-Produktion korreliert, die höher war als in dem zuvor benutzten LS-Medium (Medium 9, Abb. 48). In den meisten Medien wurde die Bildung des Alkaloids sogar vollständig eingestellt.

Nr.	Salze und Vitamine nach	Hormone	C-Quelle	N-Quelle	weitere Zusätze
1	WHITE, 1939	2,4-D (3 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---
2	WHITE, 1939	2,4-D (3 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	Kokosmilch (150 ml/l)
3	KNUDSON, 1946	---	Saccharose (20 g/l)	---	---
4	HELLER, 1953	---	Glucose (50 g/l)	---	---
5	HELLER, 1953	3-IES (1 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---
6	MURASHIGE u. SKOOG, 1962	---	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (1 g/l)	---
7	MURASHIGE u. SKOOG, 1962	Kinetin (0,25 mg/l) 2,4-D (2 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (1 g/l)	---
8	LINSMAIER u. SKOOG, 1965	2,4-D (5 mg/l)	Saccharose (30 g/l)	---	---
9	LINSMAIER u. SKOOG, 1965	2,4-D (0,22 mg/l) 1-NES (0,19 mg/l)	Saccharose (30 g/l)	---	---
10	BLAYDES, 1966	---	Saccharose (30 g/l)	---	---
11	GAMBORG et al., 1968	1-NES (1,86 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---
12	GAMBORG et al., 1968	2,4-D (1 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (1 g/l)	---
13	GAMBORG et al., 1968	2,4-D (1 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---
14	GAMBORG et al., 1968	2,4-D (2 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---

Nr.	Salze und Vitamine nach	Hormone	C-Quelle	N-Quelle	weitere Zusätze
15	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (5 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---
16	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (1 mg/l) Kinetin (2 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (1 g/l)	---
17	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (2 mg/l) Kinetin (0,5 mg/l) 1-NES (0,5 mg/l) 3-IES (0,5 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---
18	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (0,1 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---
19	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (1 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---
20	Gamborg <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (2 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---
21	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (1 mg/l) 6-BAP (0,2 mg/l)	Glucose (79 g/l)	---	---
22	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	3-IES (1 mg/l) 6-BAP (0,1 mg/l)	Glucose (79 g/l)	---	---
23	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968	2,4-D (2 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	Kokosmilch (200 ml/l)
24	GAMBORG <u>et al.</u> , 1968 ohne Phosphat	2,4-D (2 mg/l) 1-NES (0,5 mg/l) 3-IES (0,5 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	NZ-Amine (2 g/l)	---
25	NITSCH und NITSCH, 1969	---	Saccharose (20 g/l)	---	---
26	NITSCH und NITSCH, 1969	2,4-D (5 mg/l)	Saccharose (20 g/l)	---	---

Nr.	Salze und Vitamine nach	Hormone	C-Quelle	N-Quelle	weitere Zusätze
27	VELICKY und MARTIN, 1969	---	Saccharose (20 g/l)	NZ Amine (2 g/l)	---
28	GRESSHOFF und DOY, 1972	1-NES (8 mg/l) Kinetin (0,01 mg/l)	Glucose (20 g/l)	---	---
29	RINGE, 1972	6-BAP (1,13 mg/l) 3-IES (0,1 mg/l)	Saccharose (50 g/l)	---	---

Tab. 17: Zusammensetzung der Medien, die zur Kultivierung der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049 eingesetzt wurden, um ihren Einfluß auf die Thebain-Bildung zu untersuchen (vgl. Abb. 48). 2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure; 3-IES: 3-Indolessigsäure; 1-NES: 1-Naphtyl-essigsäure; 6-BAP: 6-Benzylaminopurin.

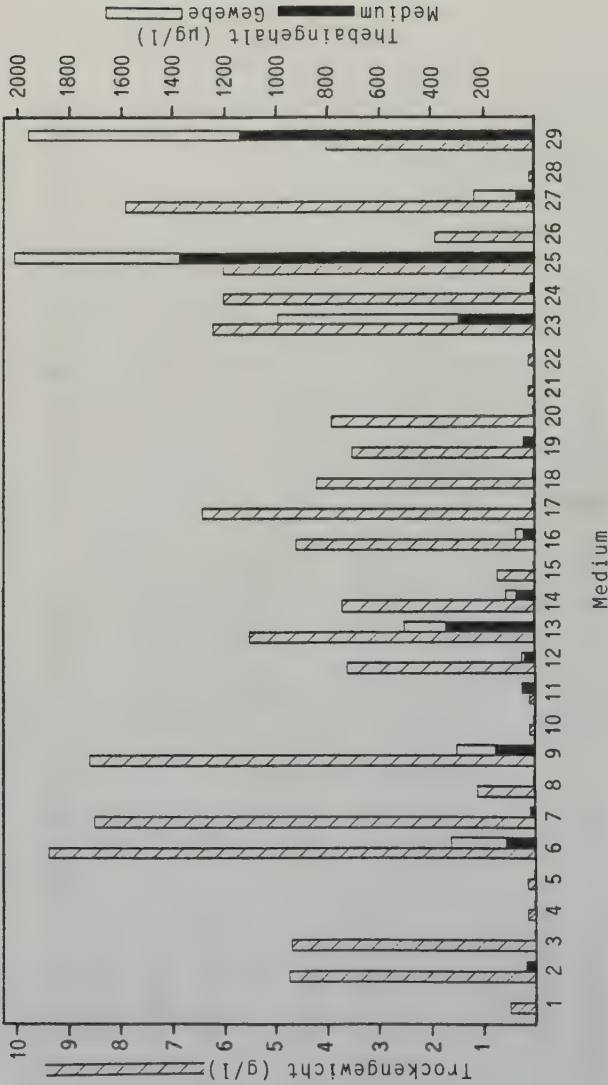


Abb. 48: Wachstum und Thebainbildung der Suspensionskultur *Papaver somniferum*/P049 bei Kultivierung in verschiedenen Medien. Zusammensetzung der Medien 1-29: vgl. Tab. 17. Anlage und Anzucht der Versuchskulturen: vgl. II.2.5. Mittelwerte aus je zwei Kolben.

Interessanterweise konnte Thebain nicht nur in den Gewebeeextrakten nachgewiesen werden, sondern es waren oftmals über 50 % der insgesamt gebildeten Thebain-Menge im Kultivierungsmedium enthalten.

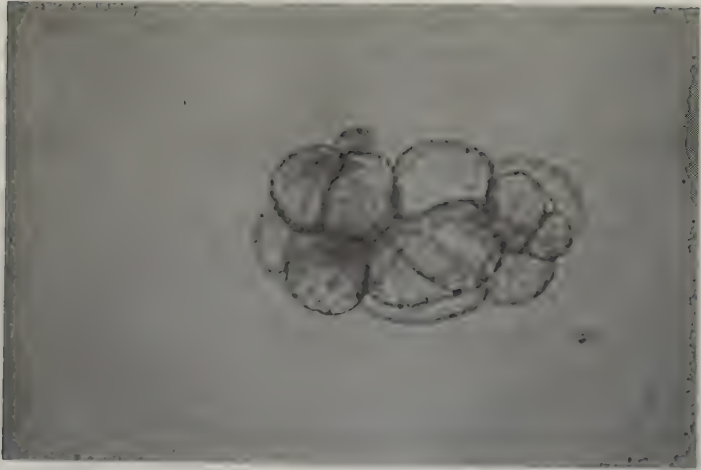
Die höchsten Thebain-Mengen (2000 µg/l) wurden gefunden, wenn die Suspensionskultur in einem hormonfreien Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) angezogen worden war. Der Thebain-Gehalt war hier gegenüber dem ursprünglich verwendeten LS-Medium um den Faktor 6-7 gesteigert. Mit dieser Steigerung einher geht eine Veränderung der Kultur (Abb. 49). Die in LS-Medium beigebraune, fein suspendierte Kultur färbt sich im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) dunkelgrau und es bilden sich größere Zellaggregate. Mikroskopisch ist erkennbar, daß diese Aggregate aus sehr großen Zellen bestehen. Dies könnte auf eine Redifferenzierung des Gewebes hindeuten (CONSTABEL et al., 1980), die wiederum die eigentliche Ursache für die gesteigerte Alkaloid-Bildung sein kann.

Qualitative und quantitative Variationen der Vitaminzusammensetzung des Mediums nach NITSCH und NITSCH (1969) erbrachten keine höheren Ausbeuten an Thebain. Deshalb wurde für die folgenden Untersuchungen zum Einfluß von Hormonen und der Saccharose-Konzentration auf die Thebain-Produktion Kultivierungsmedium benutzt, das Salze und Vitamine nach NITSCH und NITSCH (1969) enthielt.

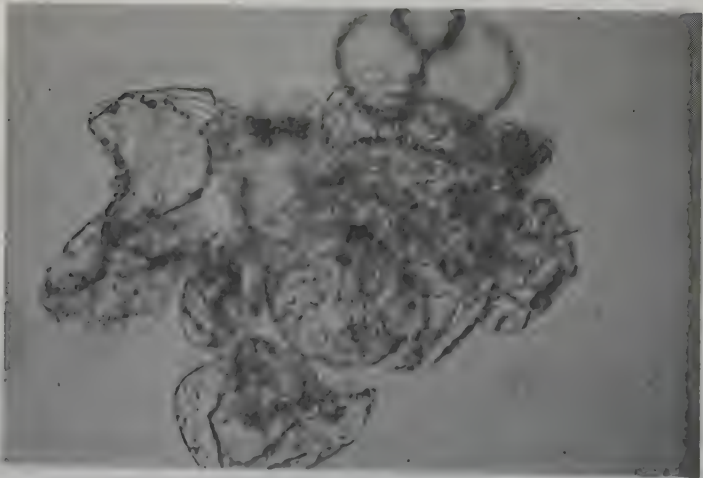
8.2.2.2. Abhängigkeit der Thebain-Bildung von der Saccharose-Konzentration

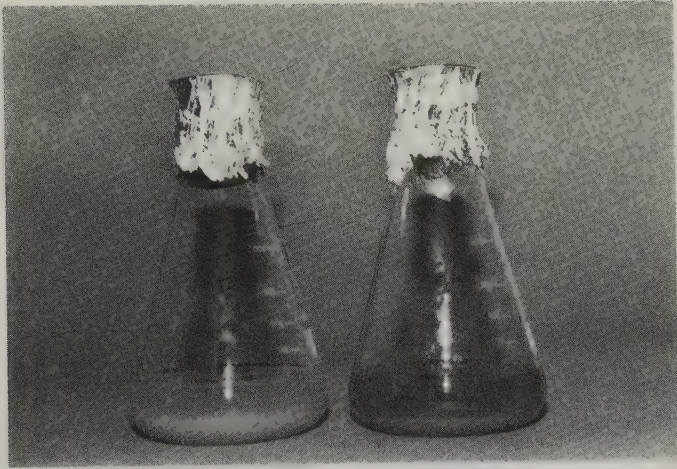
In einem nächsten Experiment sollte der Einfluß der Saccharose-Konzentration auf die Thebain-Bildung der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049 untersucht werden. Hierzu wurden Versuchskulturen (vgl. II.2.5.) in einem Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) angezogen, das unterschiedliche Saccharose-Konzentrationen (0,2 - 10 %) enthielt. Als Aus-

A



B





C

D

Abb. 49: Mikroskopische (Vergrößerung: 123fach) und makroskopische Aufnahme einer Suspensionskultur von *Papaver somniferum*/P049, kultiviert im Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) (A,C) und nach NITSCH und NITSCH (1969) (B,D).

gangsmaterial für diese Versuchskulturen diente Gewebe, das neun Tage in demselben Medium, mit 2 % Saccharose supplementiert, kultiviert worden war. Nach Aufarbeitung der Suspensionskulturen und radioimmunologischer Analyse der Zellextrakte und Medien (vgl. II.2.7.) ergab sich das in Abbildung 50 dargestellte Ergebnis des Versuchs.

Das Wachstum der Zellkultur war mit 3,5 g Trockengewicht pro Liter Medium bei Saccharose-Konzentrationen zwischen 1 % und 3 % maximal. Sowohl höhere als auch niedrigere Zuckermengen führten zu einer deutlichen Erniedrigung der Gewebemengen. Mit einer Einschränkung des Wachstums bei höheren Konzentrationen korreliert war das Auftreten von Restsaccharose im Medium. Die Thebain-Produktion des Suspensionsgewebes zeigte ein ausgeprägtes Maximum bei einer Saccharose-Konzentration von 1 %. Hier betrug der Thebain-Gehalt 3600 µg/l. Eine Erniedrigung des Zucker-Gehaltes auf 0,5 % führte zu einer drastischen Einschränkung der Alkaloid-Bildung (450 µg/l). Höhere Saccharose-Konzentrationen haben eine allmähliche, aber dennoch deutliche Abnahme der Thebain-Produktion zur Folge. Bei 2 % Saccharose im Medium - dies entspricht der Konzentration des originalen Mediums nach NITSCH und NITSCH (1969) (vgl. III.8.2.2.1.) - beträgt der Thebain-Gehalt noch 75 % des maximal erreichten Wertes.

Bei allen Versuchskulturen wurde mehr als 50 % des insgesamt vorhandenen Thebains im Medium nachgewiesen. Das bedeutet, daß die Zellen das Alkaloid ins Kultivierungsmedium ausscheiden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durch die Variation des Medium-Zucker-Gehaltes nur eine geringfügige Steigerung der Thebain-Ausbeute (Faktor 1,3 - 1,5) erzielt werden konnte, da sich die zuvor eingesetzte Saccharosemenge als annähernd optimal für die Produktion des Alkaloids erwiesen hat.

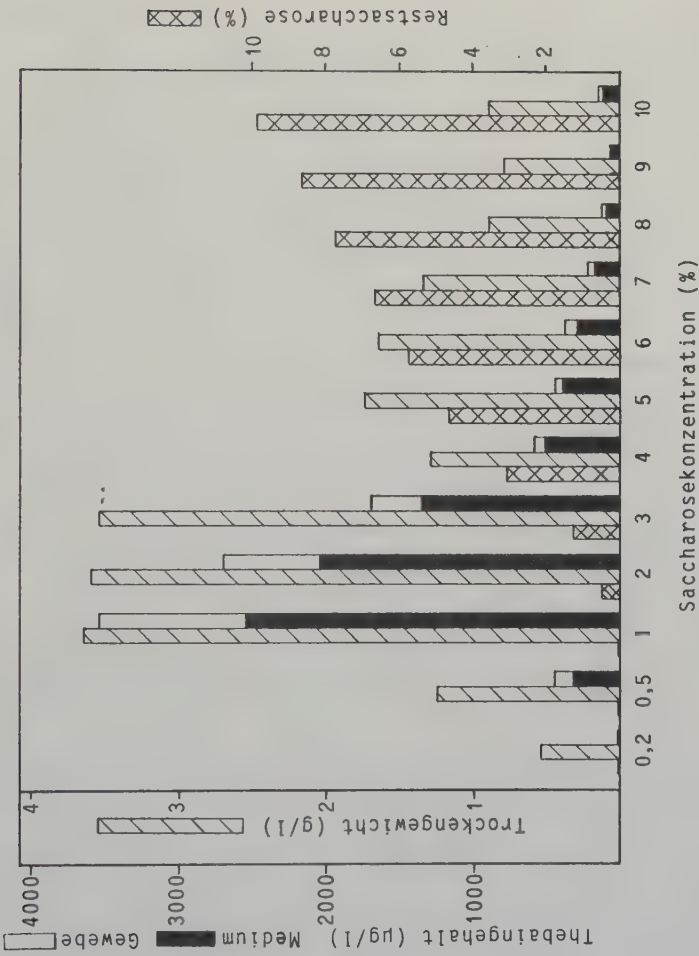


Abb. 50: Wachstum, Thebain- und Restsaccharose-Gehalt einer Suspensionskultur von *Papaver somniferum*/P049 in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration. Basismedium: hormongefreies Medium nach NITSCH und NITSCH (1969). Anlage und Anzucht der Versuchskulturen: vgl. II.2.5. Mittelwerte aus je zwei Kolben.

8.2.2.3. Auswirkung von Wuchsstoffen auf die Thebain-Produktion

Neben den Salzen, Vitaminen und der Zuckerkonzentration haben auch die im Medium vorhandenen Hormone einen Einfluß auf die Thebain-Produktion der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049. Dies konnte bereits demonstriert werden durch die Untersuchung, bei der der Einfluß der verschiedenen Medien getestet wurde (vgl. III.8.2.2.1.). Beispielsweise führte die Anwesenheit von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure in einer Konzentration von $2,3 \times 10^{-5}$ M (5 mg/l) im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) zu einer fast vollständigen Inhibierung der Thebain-Produktion; demgegenüber betrug die Thebain-Ausbeute in dem entsprechenden hormonfreien Medium 2000 µg/l.

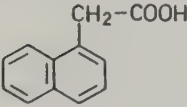
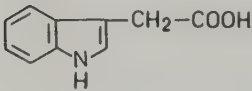
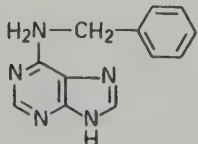
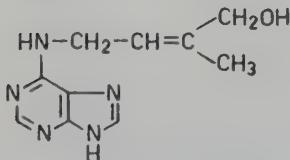
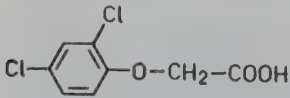
In einem weiteren Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob durch die Zugabe eines Hormons eine Steigerung der Thebain-Ausbeute erzielt werden kann. Hierzu wurden Versuchskulturen angelegt (vgl. II.2.5.), indem Suspensionsgewebe in Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) kultiviert wurde, das jeweils 1 von 200 verschiedenen synthetischen Wuchsstoffen mit Hormoncharakter enthielt. Die Zugabe des Wuchsstoffes erfolgte in einer Konzentration von 1×10^{-5} M. Das zum Anpflanzen der Versuchskulturen benutzte Zellmaterial war neun Tage in entsprechendem, hormonfreiem Medium angezogen worden.

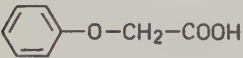
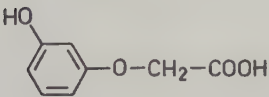
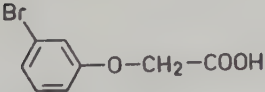
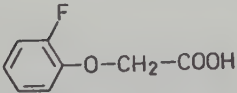
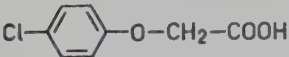
Die Auswirkungen einiger Wuchsstoffe auf die Thebain-Ausbeute und das Wachstum sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die verschiedenen Substanzen, auch wenn sie strukturell nur wenig verschieden sind, einen sehr unterschiedlichen Einfluß besaßen. Einige Wuchsstoffe, z. B. 6-Benzylaminopurin oder 2-Fluorphenoxyessigsäure, führten zur Hemmung sowohl des Wachstums als auch der Alkaloid-Produktion. Bei anderen Substanzen konnte eine Korrelation zwischen diesen zwei Parametern nicht festgestellt werden. So zeigt die Zellkultur beispielsweise in Anwesenheit von 3-Hydroxyphenoxyessigsäure mit 6,5 g Trockengewicht/l ein ebenso gutes Wachstum wie in Abwesenheit von Hormonen. Die

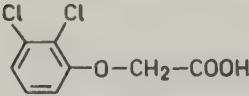
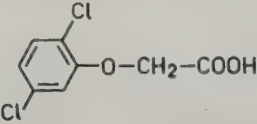
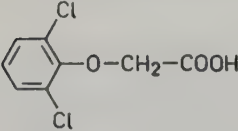
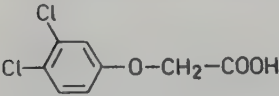
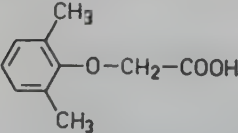
Thebain-Ausbeute betrug jedoch mit 592 µg/l nur etwa 42 % der Ausbeute, die in hormonfreiem Medium erzielt wurde. Mit einigen Wuchsstoffen, beispielsweise 3-Indolessigsäure, Kinetin oder 2,5-Dichlorphenoxyessigsäure, konnte eine deutliche Erhöhung des Alkaloidgehalts erreicht werden. Die maximale Thebain-Konzentration wurde bei Anwesenheit von 3-Bromphenoxyessigsäure verzeichnet. Sie betrug 7481 µg/l und lag damit um den Faktor 5,3 höher als bei der Vergleichskultur ohne Hormonzusatz. Die Vermehrung der Kultur war dagegen in Anwesenheit dieser Substanz nur unwesentlich ausgeprägter als im hormonfreien Medium.

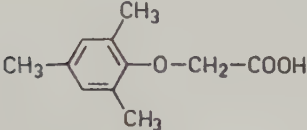
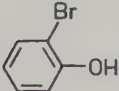
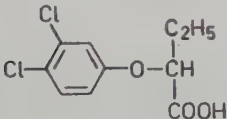
Interessanterweise bewirkten die meisten Wuchsstoffe eine deutliche Redifferenzierung des Suspensionsgewebes. Es traten zunächst große, grauschwarze Zellaggregate auf, an denen sich anschließend grüne Sproß- und Blattstücke ausbildeten. Dieser Differenzierungsvorgang war jedoch nicht mit einer ausgeprägten Thebain-Produktion korreliert. Er trat sowohl bei Hormonen auf, die eine Erniedrigung der Alkaloidbildung zur Folge hatten, als auch bei solchen, die zu einer Steigerung der Thebain-Ausbeute führten. Bei Anwesenheit von 3-Bromphenoxyessigsäure, dem Wuchsstoff, der die maximale Thebain-Produktion bewirkte, war das Gewebe beigebraun und zeigte keinerlei Anzeichen einer Differenzierung.

Der geschilderte Versuch demonstriert deutlich, daß die Art des zugesetzten Wuchsstoffes einen wesentlichen Einfluß auf die Thebain-Bildung hat. Daneben hängt die Alkaloid-Produktion jedoch auch von der Konzentration der Substanzen ab. Beispielsweise konnte im Rahmen der Untersuchung der verschiedenen Medien (vgl. III.8.2.2.1.) gezeigt werden, daß eine Erhöhung der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Konzentration von 1 mg/l auf 5 mg/l (vgl. Tab. 17, Medium 13,14,15) eine Erniedrigung des Thebain-Gehaltes von 500 µg/l auf weniger als 10 µg/l zur Folge hat (vgl. Abb. 48, Medium 13,14,15). Die Substanzen 3-Bromphenoxyessigsäure und 2,5-Dichlorphenoxy-

Wuchsstoff	TG (g/l)	Thebaingehalt (µg/l)		
		Gewebe	Medium	Gesamt
ohne Wuchsstoff	6,5	368	1039	1407
1-Naphthylessigsäure	5,9	348	798	1146
				
3-Indolessigsäure	3,6	261	2304	2565
				
6-Benzylaminopurin	2,0	5	99	104
				
Kinetin	3,4	607	2786	3393
				
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	4,4	47	185	232
				

Wachsstoff	TG (g/l)	Thebaingehalt (µg/l)		
		Gewebe	Medium	Gesamt
Phenoxyessigsäure	6,3	375	1531	1960
				
3-Hydroxyphenoxyessigsäure	6,2	191	501	592
				
3-Bromphenoxyessigsäure	6,7	3155	4326	7481
				
2-Fluorphenoxyessigsäure	1,7	11	132	143
				
4-Chlorphenoxyessigsäure	3,9	0	22	22
				

Wuchsstoff	TG (g/l)	Thebaingehalt Gewebe	Thebaingehalt Medium	Thebaingehalt (µg/l) Gesamt
2,3-Dichlorphenoxyessigsäure 	2,9	79	829	908
2,5-Dichlorphenoxyessigsäure 	5,1	830	3630	4460
2,6-Dichlorphenoxyessigsäure 	5,3	284	598	882
3,4-Dichlorphenoxyessigsäure 	3,4	19	133	152
2,6-Dimethylphenoxyessigsäure 	0,5	12	240	252

Wuchsstoff	TG (g/l)	Thebaingehalt (µg/l)		
		Gewebe	Medium	Gesamt
2,4,6-Trimethylphenoxyessigsäure	5,2	134	560	694
				
2-Bromphenol	5,0	251	1617	1868
				
2-(3,4-Dichlorphenoxy)-buttersäure	5,0	403	881	1284
				

Tab. 18: Einfluß verschiedener Wuchsstoffe auf das Wachstum und die Thebainproduktion von *Papaver somniferum*/P049. Kultivierung im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969), das den jeweiligen Wuchsstoff in einer Konzentration von 1×10^{-5} M enthielt; Anlage der Versuchskulturen und Kultivierungsbedingungen: vgl. II. 2.5. Mittelwerte aus je zwei Kolben.

essigsäure, die die höchsten Thebain-Ausbeuten ergaben, wurden deshalb in variierten Konzentrationen von 1×10^{-7} bis 5×10^{-5} M dem Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) zugesetzt; die Alkaloid-Produktion sowie das Wachstum der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049 wurde jeweils ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.

Beide Graphen offenbaren eine ausgeprägte Abhängigkeit der Thebain-Bildung und des Wachstums von der Hormonkonzentration. Für beide Wuchsstoffe erwiesen sich Konzentrationen von 1×10^{-5} M als optimal, sowohl für die Vermehrung der Kultur als auch für die Thebain-Ausbeute. Diese Konzentration war bereits zuvor eingesetzt worden, so daß durch dieses Experiment keine weitere Steigerung der Alkaloid-Produktion erzielt werden konnte.

Verglichen mit dem Vorversuch war die Thebain-Bildung in diesem Experiment sowohl in hormonfreiem Medium als auch in Medium mit 1×10^{-5} M 3-Bromphenoxyessigsäure bzw. 2,5-Dichlorphenoxyessigsäure geringer. Das demonstriert, daß die ermittelten Alkaloidausbeuten keine konstanten und völlig reproduzierbaren Werte darstellen, sondern daß sie beeinflußt werden durch geringfügige Unterschiede in der Kultur und den Kultivierungsbedingungen, die bei zwei nacheinander durchgeführten Versuchsserien auftreten können.

Trotzdem kann man konstatieren, daß durch die Variation diverser Kultivierungsparameter der Thebain-Gehalt der Suspensionskultur von Papaver somniferum/P049 deutlich gesteigert werden konnte. Gewebe, das in dem vor der Optimierung standardmäßig benutzten Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) kultiviert worden war, besaß einen maximalen Thebain-Gehalt von 320 µg/l. Im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) mit 1×10^{-5} M 3-Bromphenoxyessigsäure betrug die höchste Thebain-Konzentration 7481 µg/l; das entspricht einer signifikanten Steigerung um etwa den Faktor 23. Dennoch ist die Thebain-Ausbeute auch nach der Optimierung der Kultivierungs-

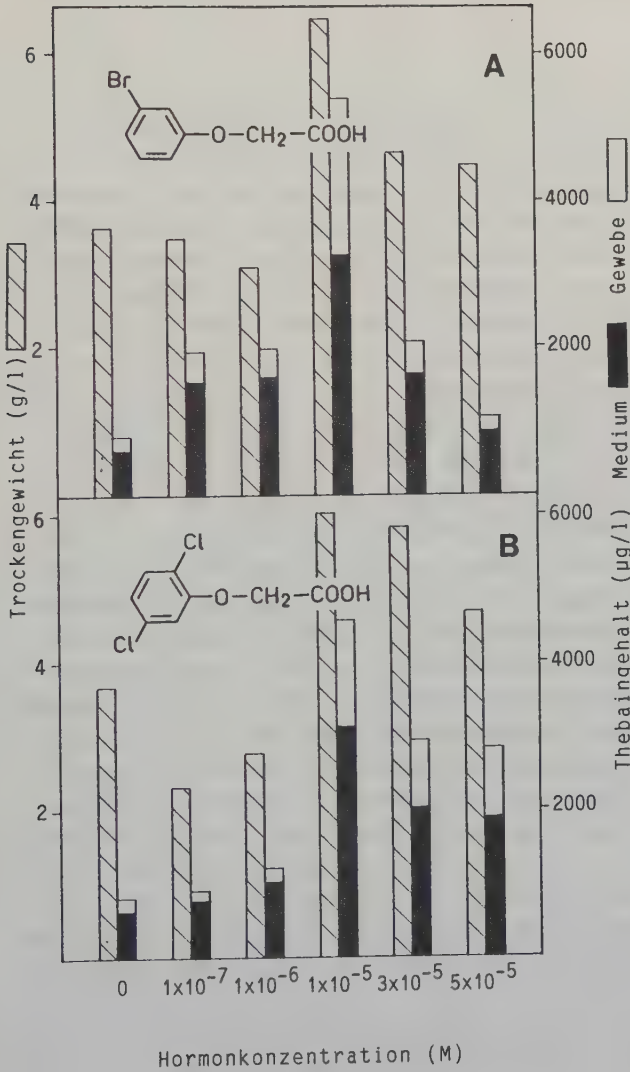


Abb. 51: Abhängigkeit des Wachstums und der Thebainproduktion der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049 von der Konzentration der Wuchsstoffe 3-Bromphenoxyessigsäure (A) und 2,5-Dichlorphenoxyessigsäure (B) im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969). Anlage und Anzucht der Versuchskulturen: vgl. II.2.5. Mittelwerte aus je zwei Kolben.

parameter noch bei weitem zu gering, als daß eine Gewinnung des Alkaloids aus der Zellkultur kommerziell vertretbar sein könnte.

8.2.3. Thebain-, Codein- und Morphin-Gehalt in varianten Zellstämmen von Papaver somniferum/P049

Plattiert man eine Suspensionskultur auf ein Festmedium aus, so wachsen aus den Zellen bzw. Zellaggregaten einzelne Kolonien heran, die in ihrem makroskopischen Erscheinungsbild, z. B. in ihrer Färbung, deutliche Unterschiede aufweisen. Dies deutet darauf hin, daß die einzelnen Kolonien zu unterschiedlichen Stoffwechselleistungen fähig sind und damit auch in ihrem Sekundärstoff-Gehalt variieren. Durch Vermehrung einer Kolonie mit einem hohen Sekundärstoff-Gehalt kann eine Steigerung der Sekundärstoff-Ausbeute bei einer Zellkultur erzielt werden, vorausgesetzt das Merkmal bleibt in dem selektierten Zellstamm stabil erhalten.

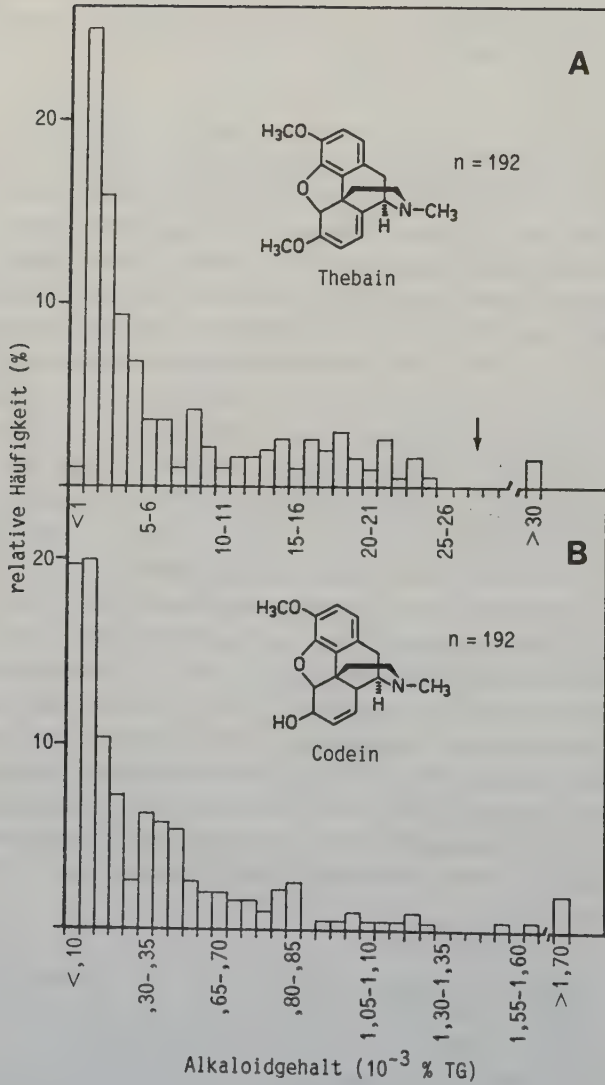
Bei der Zellkultur Papaver somniferum/P049 sollte mit Hilfe der Radioimmuntests für die Morphinan-Alkaloide untersucht werden, ob eine Steigerung des Alkaloidgehalts durch die Selektion varianter Zellstämme erzielt werden kann. Hierzu wurde Suspensionsgewebe unter den optimierten Bedingungen im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) mit 1 % Saccharose und 1×10^{-5} M 3-Bromphenoxyessigsäure angezogen und auf Festmedium der gleichen Zusammensetzung plattiert (vgl. II.2.5.). Nach 4wöchiger Kultivierung waren etwa 2 mm hohe Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm herangewachsen. Aus ihnen wurden unter sterilen Bedingungen nach der unter II.2.7. beschriebenen Methode jeweils zwei identische Proben definierter Größe (FG = 3,5 mg) entnommen. Eine der Gewebeproben wurde extrahiert (vgl. II.2.7.) und radioimmunologisch analysiert. Die andere Probe diente zur Bestimmung des Trockengewichts des Gewebes. Da sich zeigte, daß die Unterschiede

in den Trockengewichten der verschiedenen Proben nicht mehr als 10 % betrug, wurde für die Berechnung der Alkaloidgehalte der Kolonien ein einheitliches Trockengewicht von 0,21 mg ($\approx 5,9$ % des FG) zugrunde gelegt.

Die Extrakte von 192 Kolonien wurden mit Hilfe der Radioimmuntests für Thebain, Codein und Morphin untersucht. Es zeigte sich, daß nur eine Kolonie eine nachweisbare Menge Morphin enthielt, nämlich $1,7 \times 10^{-3}$ % des Trockengewichts. Alle anderen 191 untersuchten Zellstämme besaßen damit einen Morphin-Gehalt, der geringer als 6×10^{-5} % des Trockengewichts war; das entspricht der Konzentration, die unter den verwendeten experimentellen Bedingungen die Nachweisgrenze bildete.

Codein wurde in 154, Thebain in allen 192 analysierten Kolonien gefunden. Die Häufigkeitsverteilungen der Alkaloidgehalte sind in Abbildung 52 dargestellt. Sie machen deutlich, daß die Konzentration beider Alkaloide in den untersuchten Zellstämmen über einen weiten Bereich streuen. Im Falle des Codeins lag das Maximum der Häufigkeit (31 %) bei Gehalten zwischen 1×10^{-4} und $1,5 \times 10^{-4}$ % des Trockengewichts. Die Thebain-Gehalte waren um etwa eine Zehnerpotenz höher. Mit der größten Häufigkeit (25 %) waren Kolonien zu finden, deren Thebain-Konzentration im Bereich von 1×10^{-3} bis 2×10^{-3} % lag. Der maximale Thebain-Gehalt einer Zelllinie betrug $5,0 \times 10^{-2}$ %. Er lag damit geringfügig, um den Faktor 1,9, über dem Gehalt des Suspensionsgewebes, das das Ausgangsmaterial für die Plattierung bildete; für dieses

Abb. 52: Häufigkeitsverteilung des Thebain- (A) und Codein-Gehalts (B) in Zellkolonien von Papaver somniferum/P049. Anzucht der Kolonien auf Festmedium nach NITSCH und NITSCH (1969) mit 1 % Saccharose und 1×10^{-5} M 3-Bromphenoxyessigsäure. Der Pfeil kennzeichnet den Thebain-Gehalt der Ausgangskultur.



Gewebe war eine Thebain-Konzentration von $2,7 \times 10^{-2} \%$ ermittelt worden.

Nach der radioimmunologischen Analyse wurde die Kolonie mit dem höchsten Thebain-Gehalt ausgelesen und vermehrt. In weiteren Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten, muß sich zeigen, ob sie die gesteigerte Thebain-Produktion auch bei Kultivierung in Flüssigmedium aufweist und stabil über eine Anzahl von Kultivierungsstadien beibehält. Sollte dies der Fall sein, könnte die selektionierte Kultur Ausgangsmaterial für eine weitere Plattierung darstellen, aus der sich erneut Zellkolonien mit gesteigertem Alkaloidgehalt auslesen ließen.

8.3. Untersuchungen zur Biotransformation applizierter
; Alkaloid-Vorstufen durch eine Suspensionskultur
von Papaver somniferum

Durch die Variation des Zellmaterials und der Kultivierungsbedingungen konnte eine Zellsuspensionskultur von Papaver somniferum etabliert werden, die die Fähigkeit zur Biosynthese der Morphinan-Alkaloide besitzt. Während die Kultur Codein und Morphin nur in Spuren bildet ($<100 \mu\text{g/l}$), wurde ihre Thebain-Produktion durch Veränderung der Kultivierungsparameter auf annähernd 7 mg/l gesteigert. Diese Ausbeute liegt jedoch für eine rentable Isolierung größerer Substanzmengen aus pflanzlichem Zellkulturmaterial um einige Größenordnungen zu niedrig. Eine Gewinnung der Morphinan-Alkaloide mit Hilfe der Suspensionskultur von Papaver somniferum ist jedoch nicht nur möglich, indem ihre Fähigkeit zur vollständigen Neusynthese der Alkaloide ausgenutzt wird. Eventuell können höhere Ausbeuten erzielt werden, wenn verfügbare Alkaloid-Vorstufen appliziert werden und das Zellmaterial nur für ihre Biotransformation zu den gewünschten Produkten eingesetzt wird. Darüber hinaus können solche Untersuchungen

zur Biotransformation applizierter Vorstufen Aufschluß darüber geben, welche Enzyme eines Biosyntheseweges vorhanden und welche Enzyme inhibiert sind oder fehlen. Diese Frage zu klären ist interessant, weil eine Umwandlung biosynthetischer Vorstufen auch in vitro, unter der Katalyse isolierter Enzyme, erfolgen kann.

Zur Untersuchung der Biotransformationskapazität des Morphinan-produzierenden Stammes P049 der Papaver somniferum-Suspensionskultur wurde zunächst folgendes Experiment durchgeführt: Der Kultur sollten die biosynthetischen Vorstufen (R)-Retikulin, Salutaridin und Thebain appliziert werden. Hierzu wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben Versuchskulturen angelegt, die in 25 ml LS-Medium (vgl. II.2.2.) jeweils 2 mg der entsprechenden Alkaloid-Vorstufe (vgl. II.2.3.) enthielten. Weitere Kolben enthielten LS-Medium ohne applizierte Substanzen; sie sollten dazu dienen, die Alkaloide zu erfassen, die de novo vom Gewebe produziert werden. Die Kulturen wurden jeweils mit Suspensionsgewebe des Stammes P049 (3 g FG) angeimpft, das neun Tage in LS-Medium angezogen worden war. Neben den Kulturen mit Gewebe wurden Kontrollkulturen angelegt, die nur Medium und Alkaloide enthielten, aber kein Zellmaterial.

Nach 32- bzw. 168stündiger Anzucht wurden die Versuchskulturen geerntet und aufgearbeitet, wie unter II.2.7. beschrieben, und die Gewebeextrakte und Medien mit Hilfe der Tests für (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin radioimmunologisch analysiert.

In allen Kolben, die kein Suspensionsgewebe enthielten, war die eingesetzte Alkaloid-Menge auch nach der angegebenen Kultivierungsdauer noch vorhanden. Dies demonstriert zum einen, daß keine unspezifische und von der Zellkultur unabhängige Umwandlung der Vorstufen zu den gewünschten Alkaloiden erfolgt. Zum anderen zeigt es, daß die Alkaloide sich unter den verwendeten Bedingungen nicht zu Produkten zerset-

zen, die mit den Radioimmuntests nicht erfaßt werden können. Dies bedeutet, daß eine Abnahme der Alkaloidmengen in Kolben mit Gewebe auf eine Metabolisierung durch die Zellkultur zurückgeführt werden kann.

Die Alkaloidgehalte, die für die Kulturen mit Suspensionsgewebe radioimmunologisch ermittelt wurden, sind in Tabelle 19 aufgeführt. Ohne applizierte Vorstufen werden vom Gewebe geringe Mengen aller Alkaloide produziert. Um diese Mengen müssen die Werte korrigiert werden, die bei Fütterung einer Vorstufe ermittelt werden, wenn die Transformationsraten berechnet werden.

Wird (R)-Retikulin zugesetzt, so kann die Produktion von Salutaridin und Thebain gesteigert werden. Dies bedeutet, daß (R)-Retikulin vom Gewebe zu Salutaridin und Thebain metabolisiert wird. Nach 32 Stunden ist 1 % der zugesetzten (R)-Retikulin-Menge zu Salutaridin und 0,2 % zu Thebain umgesetzt worden; nach 168 Stunden betragen die entsprechenden Transformationsraten 2,7 % und 18 %. Durch längere Kultivierung kann somit die Thebain-Konzentration signifikant gesteigert werden, während der Salutaridin-Gehalt deutlich weniger zunimmt. Das bedeutet, daß Salutaridin nur ein biosynthetisches Zwischenprodukt darstellt und daß die für die Umwandlung von Salutaridin zu Thebain verantwortlichen Enzyme in dem Gewebe vorhanden sind und gebildetes Salutaridin effizient zu Thebain metabolisieren.

Dies wird ebenfalls demonstriert durch die Fütterung von Salutaridin, das nach 32 Stunden zu 7,5 % und nach 168 Stunden zu 41 % in Thebain umgesetzt worden ist.

Die für die Metabolisierung des Thebains zu Codein und Morphin verantwortlichen Enzyme besitzen in der Papaver somniferum-Zellkultur nur eine sehr geringe Aktivität. Dies wird zum einen dokumentiert durch den Befund, daß eine de novo-Synthese von Codein und Morphin nur in sehr geringem

Vorstufe	gemessene Alkaloide (mg/l)				
	(R)-Retikulin	Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
ohne	0,25/ 0,60	0,03/ 0,18	0,04/ 0,60	0,01/ 0,01	0 / 0,02
(R)-Retikulin	61 / 2,7	0,84/ 2,3	0,21/15	0,01/ 0,08	0 / 0,03
Salutaridin	--- / ---	46 / 2,0	6,0 /33	0,01/ 0,01	0 / 0
Thebain	--- / ---	--- / ---	74 /56	0,01/ 0,01	0 / 0,02

Tab. 19: Radioimmunologisch ermittelte Alkaloid-Mengen in den Versuchskulturen zur Untersuchung der Biotransformation von Morphin-Vorstufen durch die Zellkultur Papaver somniferum/P049. Die Kulturen enthielten (in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben): 25 ml LS-Medium (vgl. II.2.2.), soweit angegeben 2 mg der jeweiligen Alkaloid-Vorstufe ($\approx$ 80 mg/l) und 3 g Suspensionsgewebe (FG), das 9 Tage im zuvor genannten Medium angezogen worden war. Die Aufarbeitung der Kulturen für die radioimmunologische Analyse erfolgte wie unter II.2.7. beschrieben. Der in der Tabelle zuerst angegebene Wert gibt den Alkaloid-Gehalt nach 32-stündiger Kultivierung wieder; der zweite Wert entspricht dem Alkaloid-Gehalt nach 168-stündiger Kultivierung.

Ausmaß stattfindet, während Thebain in deutlich höheren Konzentrationen gebildet wird. Zum anderen kann durch Applikation von (R)-Retikulin, Salutaridin oder Thebain keine Steigerung des Codein- und/oder Morphin-Gehaltes erreicht werden. In der Metabolisierung von (R)-Retikulin und Salutaridin stellt Thebain das Endprodukt dar. Wird Thebain selbst gefüttert, können auch nach 168stündiger Kultivierung noch 70 % der eingesetzten Substanzmenge nachgewiesen werden. Die übrigen 30 % wurden zu Produkten transformiert, die radioimmunologisch nicht erfaßt werden.

Ebenso wie Thebain werden auch (R)-Retikulin und Salutaridin in großem Maße zu Verbindungen metabolisiert, die radioimmunologisch nicht nachgewiesen werden können. Die Transformationsrate zu diesen Verbindungen beträgt nach 168 Stunden im Falle von (R)-Retikulin 79 % und von Salutaridin 59 %.

Nachdem durch diesen Versuch gezeigt werden konnte, daß in LS-Medium angezogenes Gewebe von Papaver somniferum/P049 die Kapazität zur Biotransformation von (R)-Retikulin und Salutaridin zu Thebain besitzt, wurde ein entsprechender Versuch in erweiterter Form durchgeführt. Es wurden neben (R)-Retikulin, Salutaridin und Thebain weitere Vorstufen eingesetzt, und zwar (R)- und (S)-Norretikulin, (S)-Retikulin und Codein. Darüber hinaus wurden die Verbindungen an Papaver somniferum-Gewebe appliziert, das in Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) kultiviert wurde. Hiermit sollte untersucht werden, ob unter diesen Bedingungen, die sich als geeigneter für die Thebain-Produktion der Kultur erwiesen hatten (vgl. III.8.2.2.1.), auch die Biotransformationskapazität gesteigert werden kann.

Es wurden, ganz analog wie im zuvor beschriebenen Experiment, Versuchskulturen angelegt, indem 3 g Suspensionsgewebe (FG) in 25 ml Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) ohne Vorstufe oder mit jeweils 2 mg der aufgeführten Alkaloide

32 bzw. 168 Stunden kultiviert wurde. Das zum Animpfen der Kulturen benutzte Zellmaterial war 9 Tage in Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) angezogen worden. Wie zuvor beschrieben, wurden darüber hinaus Kontrollkulturen angesetzt, die nur Medium und Vorstufen, aber kein Gewebe enthielten; sie wurden wie die Versuchskulturen behandelt. Die radioimmunologische Analyse dieser Kontrollen ergab, analog zur ersten Vorstufen-Fütterung, daß keine unspezifische Veränderung der Alkaloidgehalte auftrat.

Die Ergebnisse der Alkaloid-Bestimmungen, die mit Hilfe der Radioimmuntests für (S)- und (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain, Codein und Morphin durchgeführt wurden, faßt Tabelle 20 zusammen.

Hieraus ist ersichtlich, daß alle radioimmunologisch bestimmbaren Alkaloide bereits gebildet werden, wenn das Medium keine biosynthetische Vorstufe enthält. Gegenüber dem LS-Medium ist im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) die Produktion von (R)-Retikulin und Salutaridin geringfügig (ca. 3fach) und die Thebain-Produktion signifikant (ca. 15-25fach) angestiegen. Dies steht in Übereinstimmung mit den zuvor genannten Ergebnissen (vgl. III.8.2.2.1.). Codein und Morphin sind in beiden Medien nur in geringen Mengen nachweisbar.

Die Zugabe von (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin führte nicht zu einer Steigerung der anderen, radioimmunologisch bestimmten Alkaloide. Dies kann zwei Ursachen haben:

1. In der Zellkultur fehlt das Enzymsystem, das die für die Biosynthese der Morphinan-Alkaloide notwendige Konfigurationsumkehr von (S)- zu (R)-Norretikulin bzw. Retikulin katalysiert.

2. Das Enzymsystem ist zwar vorhanden, aber die Umsetzung von (S)-Norretikulin bzw. (S)-Retikulin zu Alkaloiden, die mit den radioimmunologischen Analysen nicht erfaßt werden können, erfolgt sehr viel schneller und effizienter als die

Vorstufe	gemessene Alkaloide (mg/l)					
	(S)-Retikulin	(R)-Retikulin	Salutaridin	Thebain	Codein	Morphin
ohne	1,6 / 7,4	0,80/ 1,9	0,13/ 0,67	1,1 / 8,8	0,02/ 0,04	0,02/ 0,04
(S)-Norretikulin	--- / ---	--- / ---	0,15/ 0,61	1,3 / 7,9	0,02/ 0,03	0,03/ 0,05
(R)-Norretikulin	--- / ---	--- / ---	0,50/ 1,6	3,6 / 27	0,03/ 0,04	0,02/ 0,04
(S)-Retikulin	20 / 5,8	2,4 / 1,8	0,13/ 0,55	1,4 / 5,3	0,02/ 0,02	0,03/ 0,04
(R)-Retikulin	1,7 / 6,0	5,4 / 4,3	1,2 / 1,1	4,4 / 18	0,02/ 0,03	0,02/ 0,04
Salutaridin	--- / ---	--- / ---	2,5 / 2,3	54 / 61	0,02/ 0,04	0,02/ 0,04
Thebain	--- / ---	--- / ---	--- / ---	67 / 57	0,03/ 0,03	0,02/ 0,04
Codein	--- / ---	--- / ---	--- / ---	--- / ---	63 / 58	0,03/ 0,04

Tab. 20: Radioimmunologisch ermittelte Alkaloid-Mengen in den Versuchskulturen zur Untersuchung der Biotransformation von Morphin-Vorstufen durch eine Suspensionskultur von Papaver somniferum/p049. Die Kulturen enthielten (in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben): 25 ml Medium nach NITSCH und NITSCH (1969), soweit angegeben 2 mg der jeweiligen Alkaloid-Vorstufe ($\approx$ 80 mg/l) und 3 g Suspensionsgewebe (FG), das 9 Tage in dem zuvor genannten Medium angezogen worden war. Die Aufarbeitung der Kulturen für die radioimmunologische Analyse erfolgte wie unter 11.2.7. beschrieben. Der in der Tabelle jeweils zuerst angegebene Wert gibt den Alkaloidgehalt nach 32-stündiger Kultivierung wieder; der zweite Wert entspricht dem Alkaloidgehalt nach 168-stündiger Kultivierung.

Bildung der Morphinan-Alkaloide. Die Gegenwart (S)-Retikulin-metabolisierender Enzyme wird dadurch offenkundig, daß (S)-Retikulin nach 168stündiger Kultivierung nur noch in den Mengen vorhanden ist, in denen es auch de novo von der Kultur synthetisiert wird.

Ebenso wie im ersten Versuch konnte eine Biotransformation von (R)-Retikulin zu Salutaridin und Thebain festgestellt werden. Darüber hinaus erwies sich auch (R)-Norretikulin als geeignete Vorstufe für die Produktion der beiden Alkaloide. Die Rate der Transformation von (R)-Norretikulin zu Thebain, die nach 168stündiger Kultivierung bestimmt wurde, lag mit 22 % deutlich höher als die vergleichbare Rate von (R)-Retikulin zu Thebain, die 12 % betrug. Dies ist insofern bemerkenswert, als die Metabolisierung von Norretikulin einen zusätzlichen Schritt, nämlich die Methylierung des Stickstoffs, erfordert. Eine plausible Erklärungsmöglichkeit für die bessere Umsetzung von Norretikulin, verglichen mit Retikulin, wäre eine effizientere und schnellere Aufnahme dieser Verbindung in die Zellen. Inwieweit (R)-Norretikulin durch Methylierung zu Retikulin umgesetzt wird, konnte mit Hilfe der radioimmunologischen Analytik nicht ermittelt werden, da Norretikulin im Retikulin-Ria kreuzreagiert und somit in Anwesenheit von Norretikulin keine exakte Quantifizierung von Retikulin vorgenommen werden kann.

In Übereinstimmung mit dem ersten Experiment erwies sich auch Salutaridin als geeignete biosynthetische Vorstufe von Thebain. Die Transformationsraten betrugen nach 32 und 168 Stunden je 65 %. Die Umsetzung von Salutaridin zu Thebain erfolgte damit bei Anzucht der Zellkultur im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) deutlich schneller als im LS-Medium; im LS-Medium konnten nach 32 Stunden erst 7,5 % des Salutaridins in Thebain wiedergefunden werden. Man könnte nun spekulieren, daß die schnellere Umsetzung von appliziertem Salutaridin zu Thebain und auch die höhere de novo-Thebain-

Synthese im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) auf eine gesteigerte Aktivität der Enzyme zurückzuführen ist, die die Umwandlung von Salutaridin zu Thebain katalysieren. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die größere Transformationsrate von Salutaridin wäre, daß in dem veränderten Kultivierungsmedium die Substanz besser von den Zellen aufgenommen werden kann.

Eine Metabolisierung von Thebain zu Codein und Morphin konnte auch durch die Variation des Mediums nicht erreicht werden. Darüber hinaus war die Zellkultur auch nicht in der Lage, die Demethylierung von Codein zu Morphin durchzuführen. Dieser Befund zeigt, daß die Unfähigkeit der Zellkultur zur Synthese von Codein und Morphin darauf zurückzuführen ist, daß sie weder die Umsetzung von Thebain zu Codein noch von Codein zu Morphin durchführen kann.

Durch radioimmunologische Analysen wurde eine Biotransformation von (R)-Retikulin zu Thebain festgestellt. Um sicherzustellen, daß dieser Befund nicht auf die Interferenz von anderen, Thebain-ähnlichen und deshalb kreuzreagierenden Substanzen zurückzuführen ist, sollten die radioimmunologischen Untersuchungen durch eine massenspektrometrische Analyse des Reaktionsproduktes verifiziert werden.

Hierzu wurde Kultivierungsmedium (Volumen: 25 ml) nach NITSCH und NITSCH (1969) aufgearbeitet, in dem Papaver somniferum/P049-Gewebe (3 g FG) 168 Stunden in Anwesenheit von 2 mg (R)-Retikulin angezogen worden war. Radioimmunologisch war für das Medium ein Thebain-Gehalt von 340 µg/25 ml ermittelt worden. Es wurde zunächst auf eine XAD-Adsorberharzsäule (2 cm ø x 6 cm Höhe) gegeben, von der die Alkaloide mit Methanol eluiert werden konnten. Aus diesem methanolischen Eluat wurde nach einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung eine Substanz isoliert, deren R_f-Wert mit dem authentischen Thebains übereinstimmte (vgl. II.6.; Laufmittelsystem 7; R_f (Retikulin)= 0,16; R_f (Salutaridin)= 0,32;

Rf (Thebain)= 0,68). Sie wurde durch zweidimensionale Chromatographie weiter gereinigt (vgl. II.6; 1. Laufmittelsystem 16; Rf (Thebain)= 0,63; 2. Laufmittelsystem 9; Rf (Thebain)= 0,80). In beiden Laufmittelsystemen besaß das Produkt ein mit authentischem Thebain identisches Laufverhalten. Die massenspektrometrische Analyse der Substanz zeigte ein Fragmentierungsmuster, das mit dem authentischer Referenzsubstanz völlig übereinstimmte (Abb. 53). Damit wurde sichergestellt, daß es sich bei dem Produkt der Biotransformation von (R)-Retikulin um Thebain handelte.

Mit den hier dargestellten Biotransformationsversuchen konnte gezeigt werden, daß die Zellkultur Papaver somniferum/P049 prinzipiell die Fähigkeit besitzt, die biosynthetischen Vorstufen der Morphinan-Alkaloide (R)-Norretikulin, (R)-Retikulin und Salutaridin zu Thebain zu metabolisieren. Inwieweit die erzielten Ergebnisse auf Transformationen größeren Maßstabs übertragbar sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Es bleibt daher weiteren Experimenten vorbehalten, zu überprüfen, ob durch Applikation größerer Alkaloidmengen eine Steigerung der Ausbeuten und damit eine biotechnologische Gewinnung der Morphin-Alkaloide mit Hilfe der Zellkultur Papaver somniferum/P049 erreicht werden kann.

8.4. Biotransformation von (R)-Retikulin durch immobilisierte Pflanzenzellen von Papaver somniferum

Nachdem sich erwiesen hatte, daß eine Biotransformation von biosynthetischen Morphin-Vorstufen zu dem Alkaloid Thebain mit Hilfe der Suspensionskultur Papaver somniferum/P049 möglich ist, sollte untersucht werden, ob unter Einsatz immobilisierter Pflanzenzellen eine Steigerung der Ausbeuten erzielt werden kann. Immobilisierte pflanzliche Zellkulturen wurden bereits von BRODELIUS et al. (1979) und ALFERMANN et

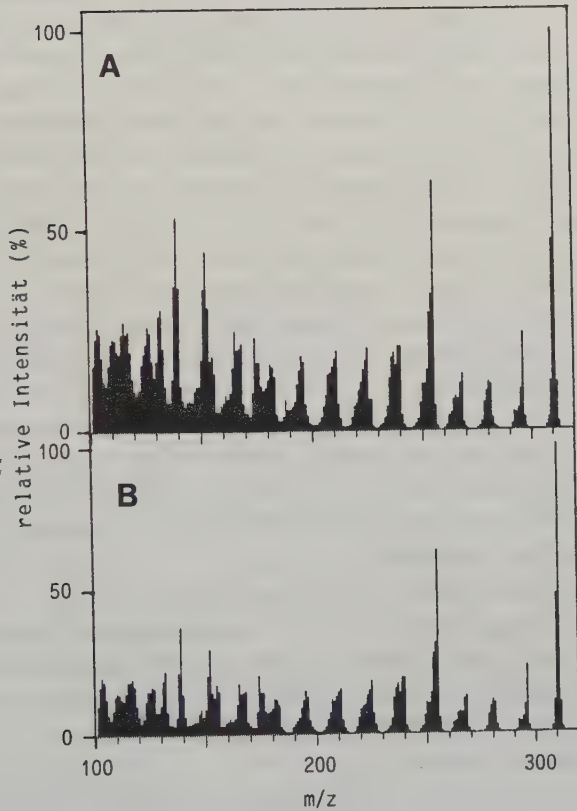


Abb. 53: Massenspektrum (A) des Produktes der Biotransformation von (R)-Retikulin durch eine Suspensionskultur von *Papaver somniferum*/P049 und authentischen Thebains (B). Die übereinstimmenden Fragmentierungsmuster demonstrieren die Identität des Produktes als Thebain.

al. (1980) erfolgreich zur Produktion und Transformation sekundärer Pflanzenstoffe benutzt. Ein Einsatz immobilisierter Pflanzenzellen zur biotechnologischen Gewinnung von Naturstoffen setzt allerdings voraus, daß die produzierten Substanzen von den Zellen ins Medium ausgeschieden werden, damit sie auf einfache Weise isoliert und die immobilisierten Zellen kontinuierlich genutzt werden können. Um die Abgabe der Stoffwechselprodukte ins Medium zu erreichen, permeabilisierten BRODELIUS und NILSSON (1983) die Zellen mit Dimethylsulf-oxid. Diese Behandlung führte jedoch zu einer stark eingeschränkten Stabilität und Produktivität der Zellen (vgl. PFITZNER, 1984). Die Suspensionskultur Papaver somniferum/PO49 schien sich besonders für einen Versuch zur Immobilisierung zu eignen, da sie einen wesentlichen Vorteil besaß: zwischen 50-70 % der von ihr de novo oder durch Biotransformation von Vorstufen gebildeten Alkaloide wurden ins Medium ausgeschieden (vgl. III.8.2.2.1.-4.). Deshalb würde sich eine unter Umständen mit Verlusten behaftete Permeabilisierung der Zellen erübrigen.

Eine schonende Methode zur Immobilisierung ganzer Zellen ist ihr Einschluß in ein Gel aus Calcium-Alginat (vgl. II.2.6.). Sie ist bereits erfolgreich bei der Immobilisierung von Mikroorganismen (TAKATA et al., 1977), tierischen (PILWAT et al., 1980) und pflanzlichen Zellen (BRODELIUS et al., 1979) angewendet worden.

Nach dem unter II.2.6. beschriebenen Verfahren wurde Suspensionsgewebe von Papaver somniferum/PO49, das 9 Tage im Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) angezogen worden war, unter sterilen Bedingungen immobilisiert. Mit dem immobilisierten Zellmaterial wurden anschließend Versuchskulturen angelegt (vgl. II.2.6.), die in 25 ml Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) 2 mg (R)-Retikulin enthielten. Daneben wurden zwei Kontrollen durchgeführt: Zur Bestimmung der Neusynthese von Alkaloiden wurden immobilisierte Zellen im angegebenen

Medium ohne Vorstufe kultiviert. Der Erfassung unspezifischer, Zell-unabhängiger Transformationen des applizierten Alkaloids diente ein Ansatz mit Medium und Vorstufe, aber ohne Gewebe. Die Versuchs- und Kontrollkulturen wurden wie unter II.2.6. angegeben kultiviert. Zu bestimmten Zeiten wurden 200 μ l-Proben des Mediums steril entnommen und mit den Tests für (R)-Retikulin, Salutaridin und Thebain radioimmunologisch analysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 21 wiedergegeben.

Es zeigt, daß weder die de novo-Produktion der drei gemessenen Alkaloide noch die Transformation von (R)-Retikulin durch die immobilisierten Zellen annähernd so hoch war wie bei der Verwendung einer Suspensionskultur. Während das Suspensionsgewebe nach 7tägiger Kultivierung über 8 mg Thebain gebildet hat, produzierten die immobilisierten Zellen unter gleichen Bedingungen nur etwa 1/50 dieser Menge, nämlich 0,14-0,16 mg. Die Umsetzung von (R)-Retikulin zu Thebain war um etwa den Faktor 10 geringer, wenn immobilisierte statt frei suspendierte Zellen eingesetzt wurden. Die niedrige Transformation des (R)-Retikulin zu Thebain bedeutet jedoch nicht, daß (R)-Retikulin im Medium wiedergefunden werden kann; nach 303stündiger Kultivierung waren dort nur noch etwa 0,1 % der eingesetzten Menge nachweisbar. Das Alkaloid wird demnach zu radioimmunologisch nicht erfaßbaren Substanzen umgesetzt. Es handelt sich um eine spezifische, zellabhängige Metabolisierung; dies konnte dadurch gezeigt werden, daß in der Kontrolle ohne immobilisiertes Gewebe die ursprünglich eingesetzte Retikulin-Menge auch nach 303stündiger Kultivierung noch wiedergefunden wurde.

Um sicherzustellen, daß die geringen Alkaloidgehalte des Mediums nicht darauf zurückzuführen sind, daß die immobilisierten Zellen die Substanzen nicht ausscheiden, sondern akkumulieren, wurde nach Abschluß der Kultivierung ihr Alkaloidgehalt ermittelt. Hierzu wurden die Calcium-Alginat-Kugeln durch Zugabe von Phosphatpuffer aufgelöst (vgl. II.2.6.)

gemessenes Alkaloid (mg/l)	Medium-Gehalt (mg/l)											Gewebe-Gehalt (mg/l) 303 h
	0 h	15 h	24 h	39 h	48 h	63 h	72 h	135 h	183 h	241 h	303 h	
(R)-Retikulin	0	0,08	0,14	0,18	0,14	0,08	0,06	0,09	0,10	0,10	0,15	0,04
Salutaridin	0	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
Thebain	0	0,07	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,10	0,14	0,13	0,16	0,05
(R)-Retikulin	83	66	64	54	41	15	6,2	0,31	0,19	0,18	0,22	0,09
Salutaridin	0,03	0,35	0,44	0,42	0,29	0,24	0,38	0,28	0,03	0,03	0,03	0,01
Thebain	0	0,26	0,39	0,56	0,77	0,90	0,94	0,97	1,1	1,2	1,2	0,20

Tab. 21: Radioimmunologisch ermittelte Alkaloidgehalte in Versuchskulturen zur Bestimmung der Biotransformation von (R)-Retikulin durch immobilisierte Zellen von Papaver somniferum/P049. Die Kulturen enthielten (in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben): 25 ml Medium nach NITSCH und NITSCH (1969), soweit angegeben 2 mg (R)-Retikulin ($\approx$ 80 mg/l) und 60 Calcium-Alginat-Kugeln mit immobilisiertem Gewebe von Papaver somniferum/P049 (vgl. II.2.6.). Weitere Erläuterungen im Text.

und das freigesetzte Zellmaterial, wie unter II.2.7. für Suspensionsgewebe beschrieben, extrahiert. Die radioimmunologische Bestimmung der Extrakte ergab die in Tabelle 21 aufgeführten Alkaloidgehalte.

Sie zeigten eindeutig, daß die geringen Ausbeuten, die mit den immobilisierten Zellen von Papaver somniferum/P049 erzielt wurden, nicht darauf zurückzuführen sind, daß die Ausscheidung der Alkaloide ins Medium blockiert ist. Offensichtlich wird die Produktivität des Gewebes durch seine Immobilisierung in starkem Maße eingeschränkt.

Ein Weg zur Gewinnung des Morphinan-Alkaloids Thebain mit Hilfe immobilisierter Zellen von Papaver somniferum/P049 konnte aufgrund der hier dargestellten Untersuchungen nicht aufgezeigt werden. In weitergehenden Experimenten muß deshalb versucht werden, schonende Techniken zu finden, die für eine Immobilisierung der Papaver somniferum-Suspensionskultur unter Beibehaltung ihrer Produktions- und Transformationskapazität geeignet sind.

IV. DISKUSSION

Eine wesentliche Voraussetzung für die zahlreichen Arbeiten, die sich mit der Gattung Papaver und ihren Alkaloiden beschäftigen - z.B. mit der Isolierung, Chemie, Biosynthese und der chemotaxonomischen Bedeutung der Papaver-Alkaloide oder mit züchterischen Problemstellungen in Hinblick auf eine industrielle Gewinnung der pharmazeutisch interessanten Morphinan-Alkaloide - sind Methoden, mit denen die Substanzen nachgewiesen und auch quantifiziert werden können. Ein solches Analysenverfahren, das sich zur Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen bereits mehrfach bewährt hat, ist der Radioimmuntest. Er zeichnet sich durch eine hohe Probenkapazität sowie eine ausgeprägte Sensitivität und Spezifität aus.

Für phytochemische Problemstellungen benutzten erstmals WEILER und ZENK (1976) erfolgreich diese Methodik. Sie diente der Bestimmung des Herzglykosides Digoxin, um Hochleistungsstämme von Digitalis lanata-Pflanzen zu selektieren. Später wurden Radioimmuntests zur Messung von z.B. Indolalkaloiden (ARENS et al., 1978; ARENS, 1979; WESTE-KEMPER et al., 1980), Ginsenosiden (SANKAWA et al., 1982), Tropanalkaloiden (WEILER et al., 1981; LEHTOLA et al., 1982), Steroidalkaloiden (WEILER et al., 1980), Sennosiden (ATZORN et al., 1981) und Nicotiana-Inhaltsstoffen (KOLOSSA, 1983) zur Klärung phytochemischer und biosynthetischer Fragestellungen entwickelt.

Es erschien aufgrund dieser Arbeiten erfolgversprechend, dieses Analysenverfahren einzusetzen, um einen Nachweis und eine exakte und einfache Quantifizierung einiger wichtiger Papaver-Alkaloide zu ermöglichen. Hierbei handelt es sich um die in der Biosynthese des Morphins auftretenden Metaboliten (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain

und Codein sowie um Morphin selbst. Für diese sechs Verbindungen wurden in dieser Arbeit Radioimmuntests aufgebaut und charakterisiert. Mit Hilfe dieser Tests sind alle wichtigen Zwischenstufen der Morphin-Biosynthese quantifizierbar. Damit kann der gesamte Ablauf des Biosyntheseweges durch die radioimmunologische Bestimmung seiner Zwischenstufen verfolgt werden.

Für die zwei Stereoisomeren des Benzylisochinolinalkaloids Retikulin sind in der Literatur bislang keine Methoden zu ihrer Quantifizierung beschrieben, die für routinemäßige Analysen mit größeren Probenzahlen eingesetzt werden könnten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Radioimmuntests zur Bestimmung von (S)- und (R)-Retikulin haben somit keine Alternative. Darüber hinaus erfüllen die immunologischen Testsysteme verschiedene Anforderungen, die an ein Verfahren zur Messung dieser Alkaloide gestellt werden müssen, die aber moderne chromatographische Analysemethoden in der geforderten Kombination nicht erfüllen können:

Eine Methode zur Bestimmung der Retikulin-Enantiomere sollte eine hohe Empfindlichkeit aufweisen. Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen gezeigt haben, liegen die Verbindungen, da sie biosynthetische Zwischenstufen darstellen, in sehr geringen Konzentrationen (oft weniger als 0,001 % TG) in den Pflanzen vor. Zur Messung solcher Gehalte müssen Verfahren eingesetzt werden, die Nachweisgrenzen von weniger als 1 ng aufweisen, besonders wenn von den zu analysierenden Proben nur sehr kleine Mengen zur Verfügung stehen, was bei vielen Untersuchungen zutrifft. Diese Empfindlichkeit besitzen nur immunologische Testverfahren; sie können mit keinem modernen chromatographischen Analyseverfahren, wie der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Gaschromatographie (GC) erreicht werden (KUBECZKA, 1984). Die in dieser Arbeit vorgestellten Radioimmuntests zur Bestimmung von (S)- und (R)-

Retikulin sind durch ausgesprochen niedrige Nachweisgrenzen von 0,020 ng für das (S)- und 0,075 ng für das (R)-Enantiomer gekennzeichnet und erlauben somit die spezifische Messung der zwei Stereoisomeren, auch wenn sie in Konzentrationen von weniger als 10^{-5} % TG vorliegen.

In den Pflanzen treten neben Retikulin eine große Anzahl weiterer Benzylisochinolinalkaloide auf, die sich von Retikulin nur durch ihr Methylierungsmuster an den aromatischen Ringen A und C unterscheiden. Eine selektive Quantifizierung von Retikulin in Anwesenheit dieser Benzylisochinoline ist mit chromatographischen Methoden ausgesprochen problematisch, da die verschiedenen methylierten Benzylisochinoline oft durch ein identisches oder sehr ähnliches Laufverhalten gekennzeichnet sind. Bei der Retikulin-Messung wird also an das Analysenverfahren der Anspruch einer hohen Spezifität gestellt, die besonders Antigen-Antikörper-Reaktionen aufweisen, die bei immunologischen Tests ausgenutzt werden. Tatsächlich erkennen die gegen (S)- und (R)-Retikulin gerichteten Antikörper selektiv das im Retikulin auftretenden Substitutionsmuster, wie Bestimmungen von Kreuzreaktionen anderer Benzylisochinoline gezeigt haben.

Für die Lösung zahlreicher Problemstellungen ist die selektive Erfassung der beiden Enantiomeren des Retikulins eine wesentliche Voraussetzung. Insbesondere bei biosynthetischen Untersuchungen ist es oft erforderlich zwischen (S)- und (R)-Retikulin zu differenzieren, da die Bildungen verschiedener Isochinolinalkaloid-Typen stereospezifisch von nur einem Enantiomer ausgehen (vgl. CORDELL, 1981). Eine selektive Messung der zwei Enantiomeren kann erfolgen, indem die Verbindungen getrennt und anschließend jeweils einzeln quantifiziert werden. Darüber hinaus gibt es aber auch Möglichkeiten, ein Gemisch der zwei Enantiomeren zu analysieren, z.B. mit Hilfe des Circular dichroismus oder

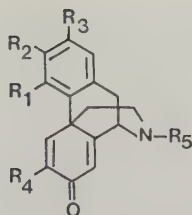
der Kernresonanzspektroskopie unter Verwendung chiraler Shiftreagentien (KUTAL, 1973). Dieses letzte Verfahren wurde von RICE und BROSSI (1980) und von NAGAKURA (pers. Mitteilung) zur Bestimmung der optischen Reinheit von Norretikulin eingesetzt. All diese Methoden können jedoch nicht bei ungereinigten Rohextrakten eingesetzt werden, sondern setzen eine Isolierung und Reinigung der Alkaloide voraus. Zweitens erfordern sie weit größere Substanzmengen (>1 mg) als in den zu analysierenden Pflanzenextrakten in der Regel vorhanden sind. Drittens ist die Analyse größerer Probenanzahlen aufgrund des apparativen und zeitlichen Aufwandes nicht möglich. Sie stellen somit keine Alternative dar zur selektiven (S)- und (R)-Retikulin-Bestimmung mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntests. Die verwendeten Antikörper erkennen hoch spezifisch die Konfiguration des Retikulins am C-Atom 1 (vgl. Abb. 2) und binden nur das Enantiomer, das auch im entsprechenden Immunogen verwendet worden ist. Selbst ein mehr als 1000facher Überschuß des jeweils anderen Stereoisomers führt nicht zu einer Verfälschung der Messwerte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Radioimmuntests für (S)- und (R)-Retikulin das erste und bisher einzige Nachweisverfahren für diese Alkaloide darstellen, das gleichzeitig eine hochempfindliche Bestimmung der Benzylisochinoline im pg-Bereich erlaubt, aufgrund seiner hohen Spezifität auch zur selektiven Messung der zwei Enantiomere in ungereinigten Rohextrakten eingesetzt werden kann und eine hohe Probenkapazität besitzt, so daß es für umfangreiche Screening-Versuche einsetzbar ist.

Für das Morphinandienon Salutaridin, das biosynthetisch aus Retikulin gebildet wird, ist, ebenso wie im Falle der Retikulin-Stereoisomeren, in der Literatur keine Nachweismethode beschrieben, die zur Messung des Alkaloids routinemäßig angewendet werden könnte. Wie bereits ausgeführt (vgl.

III.7.5.) kann Salutaridin sehr einfach und in hoher Ausbeute mit chemischen Methoden in Codein und Morphin überführt werden (vgl. SANTAVY, 1979). Deshalb stellt die Gewinnung des in verschiedenen Pflanzengattungen und Familien auftretenden Morphinandienons und seine Überführung in die Morphinan-Alkaloide eine Alternative dar zur direkten Isolierung von Codein bzw. Morphin aus Papaver somniferum. Eine wesentliche Voraussetzung für diesen alternativen Weg ist jedoch ein Verfahren zur Quantifizierung von Salutaridin, damit nach Pflanzenmaterial gesucht werden kann, das das Alkaloid in großen Mengen enthält. Auch hier bietet der Radioimmunistest die bereits zuvor ausgeführten Vorteile gegenüber anderen Analysemethoden und wurde deshalb zur Messung des Alkaloids entwickelt.

Das in dieser Arbeit vorgestellte radioimmunologische Testverfahren besitzt eine hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze = 230 pg). Durch die Bestimmung von Kreuzreaktionen konnte eine Reaktion des Salutaridin-Antiserums mit den anderen in der Biosynthese des Morphins auftretenden Metaboliten ausgeschlossen werden. Neben Salutaridin treten in einigen Arten der Gattung Papaver und Croton weitere Morphinandienon-Verbindungen auf. Hierzu gehört das Alkaloid Sinoacutin, ein Enantiomer von Salutaridin, das am C-Atom 9 eine S-Konfiguration aufweist. Es wurde u. a. aus Croton flavens isoliert (CHAMBERS und STUART, 1968; STUART et al., 1969). Weitere Morphinandienone unterscheiden sich von Salutaridin nur durch die Liganden des Stickstoffs oder durch ihr Substitutionsmuster an den Ringen A und C (vgl. Abb. 54). Hierzu gehören Norsinoacutin, Flavinin und Flavinantin, die in Croton balsamifera und Croton flavens nachgewiesen wurden (STUART et al., 1966; STUART und CHAMBERS, 1967; CHAMBERS und STUART, 1968; STUART et al., 1969), sowie Amurin, das in Papaver feddei (PFEIFER und MANN, 1966), Papaver radicum (BÖHM, 1967) und Papaver nudicaule (DÖPKE



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Alkaloid
-OH	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₃	Salutaridin (C ₉ : R-Konfiguration)
					Sinoacutin (C ₉ : S-Konfiguration)
-OH	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	Norsinoacutin (C ₉ : S-Konfiguration)
-H	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	Flavinin (C ₉ : R-Konfiguration)
-H	-OH	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₃	Flavinantin (C ₉ : R-Konfiguration)
-H	-O-CH ₂ -O-		-OCH ₃	-H	Amurin (C ₉ : R-Konfiguration)

Abb. 54: Substitutionsmuster von in Papaver und Croton-Arten auftretenden Morphinandienonen.

et al., 1968) auftritt. Darüber hinaus gibt es weitere Morphinandienone, die nicht in Papaver und Croton, sondern in den Gattungen Cassythia, Corydalis und Sinomenium gefunden wurden (STUART, 1971). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen all diese Alkaloide nicht zur Verfügung. Ihre Kreuzreaktionen müßten jedoch in weiterführenden Experimenten noch bestimmt werden, um den Salutaridin-Radioimmunttest hinsichtlich seiner Spezifität befriedi-

gend zu charakterisieren und die Interferenz dieser Substanzen bei Messungen von Pflanzenextrakten abschätzen zu können. Es ist allerdings nicht unwahrscheinlich, daß die gegen Salutaridin gerichteten Antikörper selektiv nur dieses Alkaloid erkennen und binden, ebenso wie auch die Retikulin-Antiseren Unterschiede in der Konfiguration und Substitution erkannt haben. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß in einem Papaver somniferum-Rohextrakt, nach HPLC-Auftrennung und anschließender Messung der Immunreaktivitäten im fraktionierten Eluat, keine Kreuzreaktionen unbekannter Alkaloide gefunden wurden (vgl. III.6.2.; Abb. 32).

Für die quantitative Bestimmung des Alkaloids Thebain gibt es eine große Anzahl verschiedener Methoden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Verbindung als Ausgangsmaterial für die Synthese von Codein und einiger partialsynthetischer Analgetika benötigt wird (vgl. I). Thebain wird nach Extraktion (vgl. z.B. MAGHSSOUDI und FAWZI, 1978) oder Auftrennung der zu analysierenden Extrakte durch Dünnschichtchromatographie (z.B. FAIRBAIRN und HAKIM, 1973; LAVIE et al., 1979), Gaschromatographie (z.B. FAIRBAIRN und HELLIWELL, 1974; VINCENT et al., 1979), hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (z.B. SMITH et al., 1973; NOBUHARA et al., 1980; DONER und HSU, 1982) oder hochauflösender Dünnschichtchromatographie (GUBITZ und WINTERSTEIGER, 1980) anhand seiner UV-Absorption, Fluoreszenz oder spezifischer Farbreaktionen detektiert und quantifiziert (vgl. MAGHSSOUDI und FAWZI, 1978).

All diese Methoden weisen jedoch gegenüber dem in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntest für Thebain verschiedene Nachteile auf:

Ihre Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 0,25 ng (SMITH et al., 1973) bis über 1000 ng (MAGHSSOUDI und FAWZI,

1978); die Verfahren sind somit um einige Zehnerpotenzen unempfindlicher als der Radioimmuntest, dessen Nachweisgrenze 0,055 ng beträgt.

Viele Verfahren erfordern vor der Messung einer Probe eine zeitaufwendige Reinigung der Extrakte durch mehrere Extraktionsschritte (z.B. FAIRBAIRN und HELLIWELL, 1975; VINCENT et al., 1979) oder durch Chromatographie an Adsorberharzen (SMITH et al., 1973). Mit Hilfe des Radioimmuntests können dagegen Rohextrakte analysiert werden.

Ein besonders schwerwiegender Nachteil ist die Beschränkung vieler Methoden auf die Analyse eines bestimmten Pflanzenmaterials. Die Systeme werden in Hinblick darauf ausgearbeitet, die in dem jeweiligen Pflanzenmaterial auftretenden störenden Substanzen abzutrennen. Sofern aufgrund der Verwendung anderer Materialien weitere oder andere Alkaloide in den Extrakten auftreten, können diese in den Bestimmungen interferieren und die Messwerte verfälschen. Beispielsweise entwickelten DONER und HSU (1982) ein HPLC-Verfahren zur Trennung und Quantifizierung der Alkaloide Papaverin, Thebain, Narkotin, Codein und Morphin. Diese Methode kann jedoch zur Messung von Papaverin nur dann verläßlich angewendet werden, wenn Noscapin nicht im Extrakt vorkommt, da dieses Alkaloid eine mit Papaverin absolut identische Retentionszeit besitzt. Wenn dieses Alkaloid auftritt, muß zur Papaverin-Messung ein anderes chromatographisches System eingesetzt werden. Dieses Beispiel demonstriert nochmals den Vorteil eines hochspezifischen Analysenverfahrens wie des Radioimmuntests. Das gegen Thebain gerichtete Antiserum zeigte keinerlei Kreuzreaktivität mit den anderen Zwischenprodukten der Morphin-Biosynthese oder mit strukturell ähnlichen Alkaloiden. Oripavin, das sich von Thebain nur im Substituenten am C-Atom 3 unterscheidet (vgl. Abb. 3), besaß beispielsweise eine Kreuzreaktion von nur 0,3 % im Thebain-RIA. Die Anwendbarkeit dieses Tests

ist deshalb nicht auf ein bestimmtes Probenmaterial beschränkt, sondern er kann - wie in der vorliegenden Arbeit z. B. bei der Bestimmung des Thebain-Gehaltes 100 verschiedener Papaver-Arten gezeigt werden konnte - bei der Analyse von Proben sehr verschiedener Zusammensetzung eingesetzt werden.

Ein letzter, bei vielen Versuchen aber entscheidender Vorteil des Radioimmuntests gegenüber den anderen genannten Analysenmethoden, ist seine hohe Probenkapazität. Viele der Verfahren wurden in Hinblick darauf entwickelt, eine Analytik zur Verfügung zu haben, die zur Selektion von Thebain-reichem Pflanzenmaterial, insbesondere Thebain-reichen Papaver bracteatum-Pflanzen, eingesetzt werden kann (LAVIE et al., 1979). Bei diesem Vorhaben ist ein Testsystem, das die Messung großer Probenmengen erlaubt, unabdingbar. Mit den HPLC-Methoden können etwa 30-60 Proben pro Tag analysiert werden (NOBUHARA et al., 1980; DONER und HSU, 1982). FAIRBAIRN und HELLIWELL (1975) geben für eine gaschromatographische Methode eine Zeitdauer von zwei Stunden pro Analyse an. Der Radioimmuntest dagegen ermöglicht einen bedeutend höheren Probendurchsatz von 400-700 Analysen pro Tag und Person.

Zur Quantifizierung der pharmazeutisch genutzten Alkaloide Codein und Morphin gibt es, ebenso wie für die Messung von Thebain, eine große Anzahl von Analysenverfahren, die auf HPLC, GC, GLC oder DC beruhen. Eine Zusammenstellung dieser Methoden findet sich bei GOUGH und BAKER (1982). Sie besitzen jedoch die zuvor ausgeführten Nachteile gegenüber immunologischen Testsystemen. Radioimmuntests zur Bestimmung von Codein und Morphin sind, wie bereits eingangs erwähnt (vgl. I), seit dem Anfang der siebziger Jahre zugänglich, da sie im klinischen Bereich zur Messung der Alkaloide benötigt werden. Bei den meisten dieser Tests wurden zur Erzeugung der Antikörper Konjugate eingesetzt, in

denen das Protein über die C-Atome 3 und 6 der aromatischen Ringe A und C an Morphin bzw. Codein gekoppelt war (z.B. SPECTOR und PARKER, 1970; SPECTOR et al., 1973; HSU et al., 1983). Die mit diesen Konjugaten erzeugten Antiseren können nicht differenzieren zwischen Codein und Morphin. Für die in dieser Arbeit geplanten Untersuchungen - beispielsweise für die Selektion einer Codein-reichen und gleichzeitig Morphin-armen Papaver somniferum-Pflanze - waren jedoch Radioimmuntests erforderlich, mit denen eine exakte und getrennte Quantifizierung jeder einzelnen der zwei Substanzen möglich ist, auch in Anwesenheit des jeweils anderen Alkaloids. Zur Erzeugung solcher spezifischen Antikörper hatten sich in früheren Arbeiten Konjugate als geeignet erwiesen, in denen das Alkaloid über den Stickstoff des Heterozyklus an das Protein gekoppelt worden war. GINTZLER et al. (1976) benutzten ein Normorphin-N-Essigsäure-Protein-Konjugat und erhielten Antikörper, die keine Kreuzreaktion mit Codein zeigten. FINDLAY et al. (1976) entwickelten einen RIA zur spezifischen Bestimmung von Codein, indem sie ein N-(3-Carboxypropyl)-Norcodein-BSA-Konjugat einsetzten. Schließlich konnte in unserer Arbeitsgruppe SUND (1978) zwei spezifische Testsysteme zur Messung von Codein und Morphin aufbauen; hier wurden Norcodein- bzw. Normorphin-N- β -Propionsäure-BSA-Konjugate zur Erzeugung der Antikörper verwendet.

Da sich die letztgenannten Konjugate als geeignet zur Erzeugung hochspezifischer Seren erwiesen hatten (SUND, 1978), wurden sie ebenfalls bei den in dieser Arbeit vorgestellten Radioimmuntests benutzt. Die verwendeten Antikörper besaßen die erwartete Spezifität. Morphin zeigte eine Kreuzreaktion von 0,4 % im Codein-RIA, d.h. es führte erst zur Verfälschung der Codein-Messwerte, wenn es in mehr als 200fach höherer Konzentration als Codein in den getesteten Extrakten vorlag. Codein besaß im Morphin-Ra-

dioimmuntest keine messbare Kreuzreaktivität. Alle weiteren Metaboliten der Morphin-Biosynthese reagierten ebenfalls nicht mit den Codein- bzw. Morphin-Antiserum. Von weiteren getesteten Isochinolin-Alkaloiden besaß nur Oripavin eine signifikante Kreuzreaktion von 6,2 % im radioimmunologischen Test zur Bestimmung von Morphin. Dies ist auf die strukturelle Übereinstimmung von Oripavin und Morphin im A-Ring zurückzuführen.

Die Radioimmuntests für Codein und Morphin zeichnen sich, außer durch ihre ausgeprägte Spezifität, durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Ihre Nachweisgrenzen liegen mit 0,025 ng (Codein) bzw. 0,024 ng (Morphin) in der gleichen Größenordnung wie die der von SUND (1978) entwickelten RIAs (0,019 ng beim Codein- und 0,032 ng beim Morphin-RIA). Die Tests waren 4 - 200fach empfindlicher als die meisten anderen in der Literatur beschriebenen Testsysteme, deren Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1 - 5 ng liegen (CLEELAND et al., 1976; AHERNE, 1981). Einen sehr empfindlichen Radioimmuntest zur Bestimmung von Morphin beschreiben HAHN et al. (1979). Er besitzt eine Nachweisgrenze von 0,02 ng; allerdings ist diese hohe Empfindlichkeit nicht kombiniert mit einer ausgeprägten Spezifität. Codein zeigt in diesem Test eine Kreuzreaktion von etwa 50 %. Das gleiche gilt für einen weiteren, von HSU et al. (1983) entwickelten Morphin-RIA, der von den Autoren für phytochemische Fragestellungen eingesetzt wurde (vgl. I). Dieser Test hat eine sehr niedrige Nachweisgrenze von 0,01 ng; allerdings besitzen sowohl Codein als auch Thebain signifikante Kreuzreaktionen von 50 bzw. 20 %. Damit ist mit dem Testsystem keine selektive Bestimmung von Morphin möglich. Demnach weisen die in dieser Arbeit vorgestellten Radioimmuntests, ebenso wie die von SUND (1978) entwickelten Testsysteme, gegenüber allen anderen einen wesentlichen Vorteil auf: sie kombinieren eine niedrige Nachweisgrenze mit einer ausgeprägten Spezi-

fität und erlauben deshalb eine empfindliche und zugleich selektive Messung von Codein und Morphin.

Die sechs Radioimmuntests für die Opiumalkaloide konnten zur Bearbeitung verschiedener Problemstellungen eingesetzt werden. Eine erste Anwendung bestand darin, zu untersuchen, welche der sechs radioimmunologisch messbaren Alkaloide in verschiedenen Arten der Gattung Papaver auftreten. Die Ergebnisse dieser Tests sollten zum einen Material liefern für chemotaxonomische Aussagen zur systematische Gliederung der Gattung Papaver; zum anderen erhoffte man sich, Pflanzen zu finden, die große Mengen eines der sechs Alkaloide enthielten und deshalb eine neue Quelle für die Gewinnung des Alkaloids darstellen könnten. Es wurde in erster Linie Herbarmaterial aller zugänglichen Papaver-Arten analysiert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit aller Tests bräuchten von den Herbarpflanzen nur kleine Proben mit Trockengewichten von wenigen mg entnommen zu werden, um die Alkaloide verlässlich zu quantifizieren. Trotzdem waren unter den angewendeten Extraktionsbedingungen auch Alkaloide nachweisbar, die in Konzentrationen von weniger als 10^{-3} % TG in den Pflanzen vorlagen.

Der Nachweis von Alkaloiden, die in Spuren im Pflanzenmaterial auftreten, ist besonders dann von Bedeutung, wenn die Ergebnisse für chemotaxonomische Aussagen herangezogen werden sollen. Ein Befund dieser Arbeit soll das verdeutlichen: Aufgrund der hier vorgestellten radioimmunologischen Analysen wurden in einer als Papaver gracile bestimmten Pflanze die Alkaloide Codein und Morphin nachgewiesen. Diese Papaver-Art ist von FEDDE (1909) aufgrund von morphologischen Merkmalen in die gleiche Sektion wie Papaver somniferum und Papaver setigerum eingegliedert worden, nämlich in die Sektion Mecones. Der Sektion Mecones gehören darüber hinaus P. glaucum sowie P. decaisnei, in der SLAVIK 81983) Morphin als Nebenalkaloid nachweisen

konnte, an. Nachdem in P. gracile lange Zeit keine Morphin-Alkaloide gefunden worden sind, wurden Zweifel an der von FEDDE getroffenen systematischen Zuordnung geäußert (SANTAVY, 1961). Da nun mit Hilfe der Radioimmuntests das Vorkommen von Codein und Morphin in P. gracile nachgewiesen werden konnte, werden diese Zweifel unbegründet und die von FEDDE (1909) postulierten Verwandtschaftsbeziehungen werden bestätigt.

Die radioimmunologischen Analysen der Papaver-Arten haben gezeigt, daß die Alkaloide Salutaridin und Thebain eine weitere Verbreitung zeigen als bislang mit anderen Analysenmethoden festgestellt worden ist. Salutaridin wurde bislang lediglich in Pflanzen der Papaver-Arten bracteatum, causicum, floribundum, fugax, orientale, pseudo-orientale, setigerum und somniferum gefunden (SANTAVY, 1970, 1979). Die hier dargestellten Analysen offenbarten eine weit größere Verbreitung des Alkaloids in insgesamt 62 Arten. Diese Diskrepanz ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß mit den meisten Analysenmethoden ein Nachweis des Alkaloids problematisch ist, da es in sehr geringen Konzentrationen von oft weniger als 10^{-3} % TG vorkommt. Das Auftreten von Thebain war bisher bei 8 Papaver-Arten beschrieben (vgl. I). Die radioimmunologischen Untersuchungen führten zum Nachweis des Alkaloids in 25 Arten.

Bevor diese Befunde zu Aussagen über die systematische Gliederung der Gattung Papaver herangezogen werden können, müssen zunächst die jeweiligen Herbarpflanzen aufgrund von weitergehenden morphologischen und cytologischen Untersuchungen eindeutig als die fragliche Art identifiziert werden, da stets die Möglichkeit besteht, daß das Pflanzenmaterial falsch bestimmt wurde. Dies ist besonders deshalb unerläßlich, als in der Gattung Papaver eine genaue Bestimmung der Arten wegen der großen Anzahl von Varietäten und chemischen intraspezifischen Differenzierungen sehr proble-

matisch ist (KÜHN und PFEIFER, 1963). Die richtige Benennung einiger in dieser Arbeit analysierter Herbarpflanzen konnte durch Herrn Dr. Kadereit (Heidelberg) in Zusammenhang mit seinen Untersuchungen zur Systematik einjähriger Papaver-Arten bestätigt werden.

In einer weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Analyse von Herbarmaterial wurde das Vorkommen von Salutaridin in Arten der Gattung Croton, die zur Familie der Euphorbiaceen gehört, bestätigt (vgl. III.7.5.). Tatsächlich konnte in 17 von 42 analysierten Arten das Alkaloid nachgewiesen werden. Eine Art, Croton campestris, fiel durch einen besonders hohen Salutaridin-Gehalt von 1 % TG auf. Aus diesen Befunden ergeben sich verschiedene Perspektiven für weitergehende Untersuchungen:

Von Croton campestris sollten nicht herbarisierte Pflanzen, wenn möglich verschiedener geographischer Herkünfte, analysiert werden, um zu überprüfen, ob Salutaridin aus Croton-Pflanzen gewonnen werden könnte.

Mit den Radioimmuntests steht eine einfache Analyse-methode zur Verfügung, mit der untersucht werden kann, ob die Croton-Pflanzen, ebenso wie die Papaver-Pflanzen, bei Überführung in eine Zellkultur die Produktion von Salutaridin einstellen oder ob das Morphinandienon auch von einer Croton-Zellkultur produziert wird. Sollte diese letztere Möglichkeit zutreffen, könnte versucht werden, eine biotechnologische Gewinnung von Salutaridin mit Hilfe pflanzlicher Zellkulturen von Croton zu erreichen.

Schließlich könnten entweder Croton-Pflanzen oder sogar -Zellkulturen eingesetzt werden, um die Umsetzung von Retikulin zu Salutaridin auf zellfreier Ebene nachzuweisen und das für diesen Schritt verantwortliche Enzymsystem zu isolieren und zu charakterisieren. Hier bietet sich für eine empfindliche Messung der Enzymaktivität der Einsatz

des Salutaridin-Radioimmuntests an. Frühere Versuche haben gezeigt, daß der zellfreie Nachweis dieser Phenoloxidation und vor allem die Reinigung des Enzyms aus Papaver somniferum sehr schwierig ist (HODGES und RAPOPORT, 1982a). Eventuell stellt die Croton-Pflanze ein unproblematischeres Ausgangsmaterial dar. Die Reinigung dieses Enzyms ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil sich hiermit eine Möglichkeit ergäbe, die chemisch sehr schwierig durchzuführende Oxidation von Retikulin zu Salutaridin (vgl. z.B. SCHWARZ und MAMI, 1975) einfacher mit biotechnologischen Methoden zu erreichen.

Mit den sechs Radioimmuntests stand eine Analytik zur Verfügung, mit der umfangreiche Selektionsuntersuchungen an Papaver somniferum-Pflanzen durchgeführt werden konnten. Man erhoffte sich von diesen Tests, Individuen zu finden, die sich durch hohe Gehalte eines oder mehrerer Alkaloide auszeichneten. Da von der pharmazeutischen Industrie bedeutend größere Mengen Codein als Morphin benötigt werden (vgl. I), bestand das größte Interesse dieser Untersuchung darin, Pflanzen zu selektieren, die einen hohen Codein- bei gleichzeitig niedrigem Morphin-Gehalt aufweisen. Da die industrielle Gewinnung der Morphinan-Alkaloide heute teilweise aus Opium und teilweise aus oberirdischen Teilen der Mohnpflanze, dem sogenannten Mohnstroh, erfolgt (FAIRBAIRN, 1976) wurden von jeder Pflanze sowohl Latex- als auch Blatt- und Sproßproben analysiert.

Unter den insgesamt 372 getesteten Pflanzen befand sich kein Exemplar, das durch einen besonders hohen (S)-Retikulin-, (R)-Retikulin-, Salutaridin- oder Thebain-Gehalt auffiel. Beispielsweise betrug die maximale Thebain-Konzentration, die bei einer Pflanze in der Sproßachse gemessen wurde 0,76 % TG. Eine weitere Bearbeitung dieser Pflanze erscheint nicht lohnenswert, wenn man bedenkt, daß der hochgezüchtete Papaver bracteatum-Stamm Arya II 3,5 %

Thebain in seinen oberirdischen Pflanzenteilen enthält LALEZARI et al., 1974).

Keine der analysierten Pflanzen wies in ihrem Milchsaft oder in ihren Blättern ein hohes Codein/Morphin-Verhältnis bei gleichzeitig hoher Codein-Konzentration auf. Dagegen wurden 8 Pflanzen gefunden, die für weitere Züchtungsvorhaben geeignet sein könnten, da in ihrem Sproß ein günstiges Codein/Morphin-Verhältnis und ein überdurchschnittlich hoher Codein-Gehalt gemessen wurde.

Bei der Frage nach dem Erfolg der Züchtung einer Codein-reichen Papaver somniferum-Pflanze muß man allerdings beachten, daß der Alkaloidgehalt von Papaver somniferum nicht nur durch genetische Faktoren bedingt ist. Wie umfangreiche Untersuchungen von Sarkany und Mitarbeitern in den fünfziger Jahren zeigen konnten, haben äußere Bedingungen, wie das Klima und die Beschaffenheit und Düngung der Böden, auf denen der Anbau erfolgt, einen nicht vernachlässigbaren Einfluß auf die erzielten Alkaloidausbeuten (vgl. PFEIFER, 1962a,b). Hier bietet sich mit der radioimmunologischen Analytik jedoch eine einfache Möglichkeit, den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Alkaloidgehalte zu untersuchen und die Anzucht von Pflanzen für Züchtungszwecke dann unter optimierten und genau kontrollierten Bedingungen durchzuführen.

Die in dieser Arbeit entwickelten Radioimmuntests wurden, außer zu Versuchen mit differenzierten Pflanzen, zu verschiedenen Untersuchungen mit pflanzlichen Zellkulturen eingesetzt. Mit den Radioimmuntests zur Bestimmung von (S)- und (R)-Retikulin wurden 92 Kalluskulturen verschiedener Pflanzenfamilien, die durch das Auftreten von Isochinolinalkaloiden gekennzeichnet sind, analysiert. In den meisten Fällen konnten beide Enantiomere des Benzyloisochinolins nachgewiesen werden. (S)-Retikulin hat sich als die Vorstufe einer Reihe von Isochinolinalkaloiden erwiesen, z.B.

von Protoberberinen, Benzophenanthridinen und Aporphinen (vgl. CORDELL, 1981). Deshalb ist das Auftreten dieses Alkaloids in den Kulturen zu erwarten. (R)-Retikulin konnte eindeutig als Vorstufe der Morphinan-Alkaloide bestätigt werden (BATTERSBY et al., 1965b), die jedoch in den Kulturen nicht auftreten. Darüber hinaus gibt es nur wenig Arbeiten, die zeigen, daß sich auch andere Alkaloidtypen von (R)-Retikulin ableiten. BHAKUNI et al. stellten einen Einbau von (R)-Retikulin in das Protoberberinalkaloid (R)-Sinnactin und von beiden Enantiomeren des Retikulins in das Morphinandienon Sebiferin fest, jeweils in der Menispermacee Cocculus laurifolius (BHAKUNI et al., 1978, 1983). In der gleichen Pflanze wurde eine Inkorporation von (R)- bzw. (S)-Retikulin in (R) bzw. (S)-Tetrahydropalmatin, ein Protoberberinalkaloid, beobachtet (BHAKUNI et al., 1984). Außer diesen Fütterungsexperimenten gibt es noch einige weitere Arbeiten, die über das Auftreten von Alkaloiden mit R-Konfiguration berichten, die sich biosynthetisch von Retikulin ableiten. Beispielsweise wurde in Glaucium flavum (LALEZARI et al., 1976; SHAFIEE et al., 1976) und Glaucium vitellinum (SHAFIEE und GHANBARPOUR, 1979) Salutaridin und in Glaucium flavum Aurotensin (ein partielles Razemat aus (S)- und (R,S)-Scoulerin) (MANSKE und ASHFORD, 1954) gefunden. SPÄTH et al. (1923) berichten über die Isolierung von (R)-Tetrahydropalmatin in Corydalis cava.

Da offensichtlich für die meisten Alkaloide (S)-Retikulin die biosynthetische Vorstufe darstellt, ergibt sich die Frage, wieso die R-Form in den Kalluskulturen so verbreitet auftritt. Eventuell findet in diesen Kulturen in geringem Umfang eine unphysiologische Razemisierung von (S)- zu (R)-Retikulin statt; unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß in zahlreichen der getesteten Kulturen ein Enzymsystem vorhanden ist, das die Umsetzung von (S)-Retikulin in 1,2-Dehydroretikulin katalysiert

(AMANN, 1982). Diese Reaktion bildet den ersten Schritt der von BATTERSBY et al. (1965b) postulierten Rezemisierung von (S)- zu (R)-Retikulin. Ob diese Reaktion allerdings der physiologischen Rolle dieses Enzyms entspricht, ist bislang fraglich, da es außerdem sehr effizient (S)-Tetrahydroprotuberberine zu Protoberberinium-Salzen oxidieren kann (AMANN et al., 1984).

Mit den Radioimmuntests für die Morphinan-Alkaloide ergab sich die Möglichkeit, nach Zellkulturen von Papaver somniferum zu suchen, die zur Produktion der Morphinan-Alkaloide befähigt sind. Dabei wurde nach folgender Strategie vorgegangen: Aus Samenmaterial verschiedener geographischer Herkünfte wurden 124 Kalluskulturen von Papaver somniferum neu etabliert. Man erhoffte sich, einige Kulturen zu finden, die zumindest Spuren der Morphinan-Alkaloide aufwiesen. Die radioimmunologischen Analysen ergaben jedoch nur bei einer einzigen Kultur einen positiven Befund; sie enthielt geringe Mengen der drei Morphinan-Alkaloide Thebain, Codein und Morphin. Da sich dieses Gewebe auch bei Kultivierung in Suspension als stabil hinsichtlich der Produktion der Alkaloide erwies, wurde es eingesetzt, um in einem umfangreichen Versuchsprogramm den Einfluß von Kultivierungsbedingungen auf die Alkaloid-Produktion zu untersuchen. Tatsächlich konnte durch die Variation der Medien-Zusammensetzung eine Steigerung des Thebain-Gehaltes erreicht werden. Die maximale Thebain-Konzentration betrug 7,5 mg/l Medium. In der Literatur ist bereits mehrfach über das Auftreten von Morphinan-Alkaloiden in Zellkulturen berichtet worden (vgl. I). Allerdings ist ein Vergleich der in dieser Arbeit erzielten Ausbeuten mit den Angaben anderer Publikationen sehr schwierig, weil in den meisten Fällen der Alkaloidgehalt in %, bezogen auf das Trockengewicht, angegeben wurde (Tab. 22). Die in der vorliegenden Arbeit in Suspensionskulturen gemessenen Thebain-Mengen

Literatur	Kultur	Art der Kultur	Alkaloidgehalt
KAMIMURA <u>et al.</u> , 1976	Papaver bracteatum	Suspension	0,013 % Thebain
CONSTABEL <u>et al.</u> , 1980	Papaver somniferum	Suspension	0,15 % Codein
KAWO <u>et al.</u> , 1982	Papaver somniferum	Kallus mit redifferenziertem Gewebe	0,007 % Thebain 0,002 % Codein 0,009 % Morphin
		Kallus	0,0005 % Thebain 0,003 % Codein
STABA <u>et al.</u> , 1982	Papaver bracteatum	Suspension mit redifferenziertem Gewebe	0,007 % Thebain
ZITO und STABA, 1982	Papaver bracteatum	Suspension mit redifferenziertem Gewebe	0,03 % Thebain
KUTCHAN <u>et al.</u> , 1983	Papaver bracteatum	Suspension mit redifferenziertem Gewebe	0,005 % Thebain
SCHUCHMANN und WELLMANN, 1983	Papaver somniferum	Suspension mit redifferenziertem Gewebe	0,2 % Thebain
diese Arbeit	Papaver somniferum	Kallus	0,001 % Thebain 0,00001 % Codein 0,00002 % Morphin
		Kallus nach Selektion	0,05 % Thebain
		Suspension	7,5 mg/l Thebain

Tabelle 22: Morphinan-Alkaloid-Konzentrationen in Papaver-Zellkulturen. Die prozentualen Gehalte beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht.

wurden dagegen als Gewichtsmenge pro Volumeneinheit berechnet. Diese Angabe spiegelt die Produktionsleistungen von Suspensionskulturen realistischer wieder und wurde deshalb verwendet (ZENK und DEUS, 1982).

Obwohl durch die Variation der Kultivierungsbedingungen eine signifikante Steigerung des Thebain-Gehaltes erzielt werden konnte, waren die Ausbeuten bei weitem nicht hoch genug, um eine kommerziell rentable Produktion von Thebain mit pflanzlichen Zellkulturen zu erreichen. Hierzu wäre eine weitere Steigerung der Alkaloidmengen um etwa den Faktor 100 nötig; daß pflanzliche Zellkulturen zur Bildung von Naturstoffen in dieser Größenordnung befähigt sind, wurde bereits mehrfach gezeigt. Beispielsweise konnten aus einer Suspensionskultur von Berberis stolonifera 2,7 g des Protoberberinalkaloids Jatrorrhizin pro Liter Medium isoliert werden (HINZ und ZENK, 1981).

Über die Ursachen der Unfähigkeit von Papaver-Zellkulturen Morphin-Alkaloide in den Mengen zu produzieren, die auch in den differenzierten Pflanzen zu finden sind, läßt sich nur spekulieren. Die plausibelste Erklärung ist eine strikte Kopplung der Morphinan-Biosynthese an zelluläre Differenzierungen, wie beispielsweise das Milchröhrensystem, die in den Zellkulturen nicht vorhanden sind (KUTCHAN et al., 1983; SCHUCHMANN und WELLMANN, 1983). Für diese Erklärungsmöglichkeit würde sprechen, daß bei Zellkulturen häufig beobachtet wurde, daß das Auftreten von Morphinanen mit Redifferenzierungsvorgängen in der Kultur, z.B. mit der Bildung von Wurzeln und Sprossen, verbunden war (KAMO et al., 1982; ZITO und STABA, 1982). Das in dieser Arbeit zur Thebain-Produktion verwendete Papaver somniferum-Gewebe zeigte äußerlich keine Differenzierungserscheinungen. Mikroskopisch war allerdings zu erkennen, daß mit einer Steigerung der Alkaloid-Produktion eine Vergrößerung der Zellen und die Bildung größerer Zellaggregate einherging. Eventuell

deutet dies auf eine beginnende Differenzierung des Gewebes hin.

Für das Fehlen der Morphinane in Papaver-Zellkulturen gibt es noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Die Alkaloide werden zwar gebildet, aber anschließend entweder gleich weiter metabolisiert oder an Membranstrukturen gebunden, so daß sie nicht messbar sind (HUTIN et al., 1984). Sollte dies zutreffen, wäre allerdings zu erwarten, daß Spuren der Substanzen in den Zellen auftreten und mit den empfindlichen Radioimmuntests erfasst werden können. Dies war jedoch bei 132 von 133 analysierten Kulturen nicht der Fall. Allerdings sollte man diese Möglichkeit noch weiter untersuchen, indem man z.B. versucht durch eine Behandlung mit alkalischen Lösungen oder Enzymen eine Freisetzung der eventuell gebundenen Alkaloide zu erreichen (HUTIN et al., 1984).

Neben den hier aufgeführten Fragestellungen ergeben sich weitere Einsatzmöglichkeiten für die sechs Radioimmuntests zur Bestimmung der Opiumalkaloide bei der Untersuchung der Morphin-Biosynthese auf zellfreier Ebene. Mit diesen Testsystemen stehen empfindliche und spezifische Nachweisverfahren zur Messung aller an der Biosynthese des Morphins beteiligten Enzyme zur Verfügung. Eine Reinigung und genaue Charakterisierung dieser Enzyme würde zu einer wesentlichen Erweiterung der Kenntnisse führen, die über diesen wichtigen Biosyntheseweg in den letzten 20 Jahren aufgrund von Fütterungsexperimenten erhalten wurden.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Für die fünf Isochinolinalkaloide (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Salutaridin, Thebain und Codein, die Zwischenstufen in der Biosynthesesequenz zum Morphin darstellen, sowie für Morphin selbst, wurden Radioimmuntests entwickelt. Diese Tests erlauben aufgrund ihrer hohen Spezifität eine selektive Quantifizierung jedes einzelnen der sechs Alkaloide, selbst in ungereinigten Rohextrakten. Die Anwendbarkeit der Tests konnte demonstriert werden bei Untersuchungen zum Vorkommen der sechs Alkaloide in Pflanzen der Gattungen Papaver und Croton sowie in Kallus- und Suspensionskulturen verschiedener Pflanzenarten. Darüber hinaus erwiesen sie sich als geeignet für die Optimierung der Alkaloid-Produktion einer Papaver somniferum-Suspensionskultur.

1. Zur Darstellung der Immunogene wurden die N-Norverbindungen von (S)-Retikulin, (R)-Retikulin, Thebain, Codein und Morphin durch elektrophile Addition von Acrylsäure zu den entsprechenden N-B-Propionsäure-Derivaten umgesetzt. Salutaridin wurde durch Kondensation seiner Carbonylfunktion mit Aminoxyessigsäure in Salutaridin-7-(O-carboxymethyl)-oxim überführt. Die so funktionalisierten Haptene wurden über ihre freien Carboxylgruppen unter Ausbildung einer Amidbindung an Rinderserumalbumin gekoppelt; dies geschah mit Hilfe der Carbodiimid-Reaktion. Die Konjugate aller sechs Alkaloide haben sich als geeignet erwiesen zur Erzeugung spezifischer und hoch affiner Antikörper.
2. Als radioaktiv markierte Antigene wurden bei allen sechs Radioimmuntests tritiummarkierte Verbindungen eingesetzt: Im (S)- und (R)-Retikulin-RIA wurde (S)- bzw. (R)-(NC³H₃)-Retikulin (spez. Akt.: 7,5 bzw. 3,1 Ci/mmol) benutzt, das enzymatisch mit einer Ausbeute von 39 bzw. 23 % dargestellt werden konnte. Im Salutaridin-Test dien-

ten als markierte Antigene die beiden epimeren Alkohole (7-³H)-Salutaridinol I und II (spez. Akt.: 3,1 Ci/mmol), die identische immunologische Reaktivitäten besaßen. Sie wurden durch Reduktion von Salutaridin mit NaB³H₄ mit einer Ausbeute von 2,5 % synthetisiert. (7-³H)-Thebain (spez. Akt.: 3,1 Ci/mmol) wurde aus (7-³H)-Salutaridinol I oder II durch Dehydratisierung in saurem Milieu dargestellt (Ausbeute: 20 %), (6-³H)-Codein (spez. Akt.: 20 Ci/mmol) durch Reduktion von Codeinon mit NaB³H₄ (Ausbeute: 43 %).

3. Mit den Antiseren und den markierten Antigenen konnten Radioimmuntests für die sechs Opiumalkaloide aufgebaut werden, die sich durch niedrige Nachweisgrenzen (zwischen 55 und 706 fmol) auszeichnen. Die Antiseren besitzen eine hohe Affinität: ihre Affinitätskonstanten liegen zwischen 0,4 und $8,8 \times 10^9$ l/mol. Sie können in Verdünnungen zwischen 1:72 und 1:10800 in die Tests eingesetzt werden.

Darüber hinaus wiesen sie eine ausgeprägte Spezifität auf, wie durch Untersuchung der Kreuzreaktionen von 56 Isochinolinalkaloiden festgestellt wurde. Die gegen (S)- bzw. (R)-Retikulin gerichteten Antikörper erkennen sehr spezifisch die Stereokonfiguration am C-Atom 1 (Kreuzreaktion des jeweils anderen Enantiomers: <0,1 %) und die Methylierungsmuster an den aromatischen Ringen A und C. Veränderungen im Methylierungsmuster führen grundsätzlich zu einem Verlust von über 90 % der Immunreaktivität der entsprechenden Verbindungen im Vergleich zum Retikulin. Signifikante Kreuzreaktionen besitzen im (S)- bzw. (R)-Retikulin-RIA solche Verbindungen, die sich von Retikulin nur in der Derivatisierung des Stickstoffs unterscheiden. Im Salutaridin-RIA zeigen nur die beiden epimeren Alkohole Salutaridinol I und II Kreuzreaktionen (424 und 171 %). Die gegen Thebain, Codein

und Morphin gerichteten Antikörper erkennen sehr spezifisch die jeweiligen Strukturen der Ringe A und C, wodurch eine selektive Messung von Codein bzw. Morphin, auch in Anwesenheit des jeweils anderen Alkaloids, möglich ist.

4. Die Radioimmuntests wurden eingesetzt, um in 257 herbarisierten und 83 frischen Pflanzen insgesamt 100 verschiedener Papaver-Arten das Auftreten der sechs Opiumalkaloide zu untersuchen. Hierzu wurden Extrakte von Blattproben, die Trockengewichte von nur 3 - 10 mg besaßen, analysiert. In 3 Arten konnte keines der sechs Alkaloide nachgewiesen werden. Alle übrigen Arten enthielten (S)- und/oder (R)-Retikulin. Die höchsten (S)- und (R)-Retikulin-Gehalte (0,055 bzw. 0,183 % TG) wurden in einer 8 Jahre alten, herbarisierten P. somniferum-Pflanze gemessen. Salutaridin wurde in 62 Papaver-Arten gefunden. Die maximale Salutaridin-Konzentration wies mit 0,414 % TG einer herbarisierte P. tauricola-Pflanze (Herkunft: Türkei) auf. Thebain konnte in 25 Papaver-Arten nachgewiesen werden. Der höchste Gehalt dieses Alkaloids (0,687 % TG) wurde in Herbarmaterial einer aus der Türkei stammenden P. cylindricum-Pflanze gemessen. Signifikante Mengen Codein und Morphin wurden, außer in P. somniferum und P. setigerum, in P. gracile (Herkunft: Türkei) und in P. cylindricum (Herkünfte: Türkei, Irak) gefunden. Spuren der Alkaloide waren in weiteren 15 Papaver-Arten vorhanden.
5. Anhand von Latex-, Blatt- und Sproßproben wurde der Gehalt der sechs radioimmunologisch erfassbaren Opiumalkaloide in 372 Papaver somniferum-Pflanzen 75 unterschiedlicher geographischer Herkünfte ermittelt, um Pflanzen mit besonders hohen oder niedrigen Alkaloidgehalten zu selektionieren. Die Gehalte aller sechs Alkaloide wiesen eine große Variabilität auf. 8 Pflanzen er-

wiesen sich als besonders geeignetes Ausgangsmaterial für weitere züchterische Arbeiten, da in ihren Sproß-Proben ein günstiges Codein/Morphin-Verhältnis (1,0 - 1,8) bei gleichzeitig überdurchschnittlich hohem Codein-Gehalt (zwischen 0,49 und 1,4 % TG) festgestellt wurde.

6. Anhand der Untersuchung von Herbarmaterial wurde das Auftreten von Salutaridin in der Gattung Croton bestätigt. 17 von 42 analysierten Arten enthielten das Alkaloid. Der höchsten Gehalt von 1 % TG wies ein aus Brasilien stammendes Exemplar von Croton campestris auf.
7. Von 92 Kalluskulturen 4 verschiedener Pflanzenfamilien, die durch das Auftreten von Benzyloisochinolininen gekennzeichnet sind, wurde radioimmunologisch der (S)- und (R)-Retikulin-Gehalt ermittelt. 67 Kulturen enthielten sowohl (S)- als auch (R)-Retikulin, wobei der (S)-Retikulin-Gehalt in den meisten Fällen beträchtlich höher war als der Gehalt des (R)-Enantiomers. In 11 weiteren Kalli war eines der zwei Stereoisomeren vertreten. Der höchste (S)-Retikulin-Gehalt einer Kultur wurde zu 0,33 % TG (Papaver orientale) bestimmt, die maximale (R)-Retikulin-Konzentration betrug 0,040 % TG (Berberis stolonifera).
8. Aus Samenmaterial verschiedener Herkünfte wurden 124 Kalluskulturen von Papaver somniferum neu etabliert und mit Hilfe der Radioimmuntests zur Bestimmung von Thebain, Codein und Morphin analysiert. Nur in einem einzigen Kallusgewebe konnten die drei Morphinan-Alkaloide nachgewiesen werden (10^{-3} % TG Thebain, $1,5 \times 10^{-5}$ % TG Codein und 2×10^{-5} % TG Morphin).

Nach Überführung der Kultur in Suspension erwies sie sich als stabil hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und der Produktion der Morphinan-Alkaloide. Es wurde versucht durch Variation der Kultivierungsbedingungen eine

Steigerung des Thebain-Gehaltes zu erzielen: Es wurden 11 Medien mit 29 unterschiedlichen Hormon-, Zucker- und NZ-Amin-Kombinationen getestet. Darüber hinaus wurde der Einfluß 200 synthetischer Wachstumsstoffe und der Saccharose-Konzentration auf die Thebain-Bildung untersucht. Der Thebain-Gehalt konnte durch geeignete Maßnahmen um den Faktor 23 gesteigert werden. Die maximale Ausbeute von 7,5 mg/l wurde bei Kultivierung in einem Medium nach NITSCH und NITSCH (1969) erreicht, das mit 10^{-5} M 3-Bromphenoxyessigsäure supplementiert war.

Diese Kultur war auch in der Lage applizierte Vorstufen der Morphinan-Alkaloide ((R)-Norretikulin, (R)-Retikulin und Salutaridin) zu Thebain zu metabolisieren. Eine Biotransformation von Thebain zu Codein oder Morphin bzw. von Codein zu Morphin konnte dagegen nicht festgestellt werden. (S)-Norretikulin und (S)-Retikulin wurden zu anderen, radioimmunologisch nicht erfassbaren Produkten umgesetzt.

Eine Immobilisierung der Pflanzenzellen durch ihren Einschluß in ein Gel aus Calcium-Alginat führte zu einer starken Verringerung sowohl der de novo-Synthese von Morphinan-Alkaloiden als auch der Biotransformation applizierter biosynthetischer Vorstufen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ABDEL-MONEM, M.M., PORTOGHESE, P.S.: N-Demethylation of Morphine and Structurally Related Compounds with Chloroformate Esters. *J. Med. Chem.* 15 (1972) 208-210.
- ABRAHAM, G.E.: Radioimmunoassay of Steroids in Biological Fluids. *J. Steroid. Biochem.* 6 (1975) 261-270.
- AGRICULTURE RESEARCH SERVICE: Annotated Bibliography on Opium and Oriental Poppies and Related Species. U.S. Department of Agriculture ARS-NE-28 (1973).
- AHERNE, G.W.: The Specificity of Morphine Radioimmunoassays. In: Methods of Morphine Estimation in Biological Fluids and the Concept of Free Morphine. Stuart, J.F.B. (ed.). Royal Society of Medicine, International Congress and Symposium Series 58 (1981) 21-28.
- ALFERMANN, A.W., SCHULLER, I., REINHARD, E.: Biotransformation of Cardiac Glycosides by Immobilized Cells of *Digitalis lanata*. *Planta medica* 40 (1980) 218-223.
- AMANN, M.: Untersuchungen zur Konfigurationsumkehr in der Morphin-Biosynthese. Reinigung und Charakterisierung einer (S)-Norretikulin-Dehydrogenase aus pflanzlichen Zellkulturen. Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München (1982)
- AMANN, M., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Tetrahydroprotoberberine Oxidase the Final Enzyme in Protoberberine Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 953-954.
- ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassays for the Determination of the Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in Plants. *Planta medica* 34 (1978) 37-46.
- ARENS, H.: Radioimmuntests für die Bestimmung von Indolalkaloiden. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1979).
- ATZORN, R., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Formation and Distribution of Sennosides in *Cassia angustifolia*, as Determined by a Sensitive and Specific Radioimmunoassay. *Planta medica* 41 (1981) 1-14.
- BARNES, R.A., SOEIRO, O.M.: The Alkaloids of *Croton salutaris*. *Phytochemistry* 20 (1981) 543-544.

- BARTON, D.H.R., COHEN, T.: Some Biogenetic Aspects of Phenol Oxidation. Festschrift Arthur Stoll. Birkäuser Verlag Basel (1957) 117-144.
- BARTON, D.H.R., KIRBY, G.W., STEGLICH, W., THOMAS, G.M.: The Biosynthesis and Synthesis of Morphine Alkaloids. Proc. Chem. Soc. (1963) 203
- BARTON, D.H.R., HESSE, R.H., KIRBY, G.W.: Phenol Oxidation and Biosynthesis. Part VIII. Investigations on the Biosynthesis of Berberine and Protopine. J. Chem. Soc. (1965a) 6379-6389.
- BARTON, D.H.R., KIRBY, G.W., STEGLICH, W., THOMAS, G.M., BATTERSBY, A.R., DOBSON, T.A., RAMUZ, H.: Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. (1965b) 2423-2438.
- BATTERSBY, A.R., HARPER, B.J.T.: Biogenesis of Morphine Chem. Ind. (London) (1958) 364-365.
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R.: Biosynthesis of Morphine: Formation of Morphine from Norlaudanoline. Proc. Chem. Soc. (1960) 360-361.
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., LeCOUNT, D.J.: Biosynthesis of Morphine. Proc. Chem. Soc. (1960) 287.
- BATTERSBY, A.R., HARPER, B.J.T.: Rate Study on the Incorporation of Tyrosine into Morphine, Codeine and Thebaine. Tetrahedron Lett. 27 (1960) 21-24.
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., FOULKES, D.M., FRANCIS, R.J., McCALDIN, D.J., RAMUZ, H.: 1-Benzylisoquinolines as Precursors of the Opium Alkaloids: Tracer and Stereochemical Studies. Proc. Chem. Soc. (1963) 203
- BATTERSBY, A.R., BINKS, R., FRANCIS, R.J., McCALDIN, D.J., RAMUZ, H.: Alkaloid Biosynthesis. Part IV. 1-Benzylisoquinolines as Precursors of Thebaine, Codeine and Morphine. J. Chem. Soc. (1964) 3600-3610.
- BATTERSBY, A.R., FRANCIS, R.J.: Alkaloid Biosynthesis. Part V. Experiments on Opium Alkaloids Using 3,4-Dihydroxyphenylethylamine. J. Chem. Soc. (1964) 4078-4080.
- BATTERSBY, A.R., EVANS, G.W., MARTIN, R.O., WARREN, M.E., RAPOPORT, H.: Configuration of Reticuline in the Opium Poppy. Tetrahedron Lett. (1965a) 1275-1278.

- BATTERSBY, A.R., FOULKES, D.M., BINKS, R.: Alkaloid Biosynthesis. Part VIII. Use of Optically Active Precursors for Investigations on the Biosynthesis of Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. (1965b) 3323-3332.
- BATTERSBY, A.R., MARTIN, J.A., BROCHMANN-HANSEN, E.: Alkaloid Biosynthesis. Part X. Terminal Steps in the Biosynthesis of the Morphine Alkaloids. J. Chem. Soc. (C) (1967) 1785-1788.
- BAUMINGER, S., KOHEN, F., LINDNER, H.R.: Steroids as Haptens: Optimal Design of Antigens for the Formation of Antibodies to Steroid Hormones. J. Steroid. Biochem. 5 (1974) 739-747.
- BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Recent Studies on Insulin-Binding Antibodies. Ann. N. Y. Acad. Sci. 82 (1959) 338-344.
- BHAKUNI, D.S., MANGLA, V.K., SINGH, A.N., KAPIL, R.S.: Biosynthesis of the Morphinandienone Alkaloid, Sebi-ferine. J. Chem. Soc. Perkin I (1978) 267-269.
- BHAKUNI, D.S., JAIN, S., GUPTA, S.: Absolute Configuration and Biosynthesis of (+)-Sinactine. Tetrahedron 39 (1983) 455-459.
- BHAKUNI, D.S., JAIN, S., GUPTA, S.: Biosynthesis of (+)-, (-)- and ($\pm$)-Tetrahydropalmatines. Tetrahedron 40 (1984) 1591-1593.
- BLASCHKE, G., PARKER, H.J., RAPOPORT, H.: Codeinone as the Intermediate in the Biosynthetic Conversion of Thebaine to Codeine. J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 1540-1541.
- BLAYDES, D.F.: Interaction of Kinetin and Various Inhibitors in the Growth of Soybean Tissues. Physiol. Plant. 19 (1966) 748-753.
- BÖHM, H.: Characterization of Alkaloid Spectra of Northern Poppies. Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem., Geol., Biol. 3 (1966) 325-328.
- BÖHM, H.: *Papaver bracteatum* Lindl. - Results and Problems of the Research on a Potential Medicinal Plant. Pharmazie 36 (1981) 660-667.
- BORKOWSKI, P.R., HORN, J.S., RAPOPORT, H.: Role of 1,2-Dehydroreticulium Ion in the Biosynthetic Conversion of Reticuline to Thebaine. J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 276-282.

- BROCHMANN-HANSEN, E., FURUYA, T.: A New Opium Alkaloid. Isolation and Characterization of $(\pm)$ -1-(3'-hydroxy-4'-methoxybenzyl)-2-methyl-6-methoxy-7-hydro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline ($(\pm)$ -Reticuline). *Planta medica* 12 (1964) 328-333.
- BROCHMANN-HANSEN, E., NIELSEN, B.: (+)-Reticuline - A New Opium Alkaloid. *Tetrahedron Lett.* (1965) 1271-1274.
- BROCHMANN-HANSEN, E.: A Second Pathway for the Terminal Steps in the Biosynthesis of Morphine. *Planta medica* 50 (1984) 343-345.
- BRODELIUS, P., DEUS, B., MOSBACH, K., ZENK, M.H.: Immobilized Plant Cells for the Production and Transformation of Natural Products. *FEBS Lett.* 103 (1979) 93-97.
- BRODELIUS, P., NILSSON, K.: Permeabilization of Immobilized Plant Cells, Resulting in Release of Intracellularly Stored Products with Preserved Cell Viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 (1983) 275-280.
- CEKAN, Z.: Assessment of Reliability of Steroid Radioimmunoassays. *J. Steroid. Biochem.* 6 (1975) 271-275.
- CHAMBERS, C., HAYNES, L.J., STUART, K.L.: Norsinoacutine and Salutaridine Isolated from *Croton balsamifera* Jacq. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1966) 449.
- CHAMBERS, C., STUART, K.L.: Flavinantine and Flavinine, Novel Morphinandienone Alkaloids from *Croton flavens* L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1968) 328-329.
- CHARD, T., MARTIN, M., LANDON, J.: Separation of Antibody Bound from Free Peptides Using Ammonium Sulphate and Ethanol. In: *Radioimmunoassay Methods*. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.). Edinburgh und London (1971) 257-265.
- CHARD, T.: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam 6 (1978).
- CHEETHAM, P.S.J., BLUNT, K.W., BUCKE, C.: Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels. *Biotechnology and Bioengineering* 21 (1979) 2155-2168.
- CHERVU, L.R., MURTY, D.R.K.: Radiolabeling of Antigens: Procedures and Assessment of Properties. In: *Radioimmunoassay*. Freeman, L.M., Blaurock, M.D. (eds.). Grune & Stratton Verlag New York San Francisco London (1975) 33-48.

- CLEELAND, R., CHRISTENSON, J., USATEGUI-GOMEZ, M., HEVERAN, J., DAVIS, R., GRUNBERG, E.: Detection of Drugs of Abuse by Radioimmunoassay: A Summary of Published Data and Some New Information. *Clin. Chem.* 22 (1976) 712-725.
- CONSTABEL, F., KURZ, W.W., TAM, W.H.J.: Verfahren zur Herstellung von Codein aus Pflanzenzellkulturen. Offenlegungsschrift 300740 Deutsches Patentamt (1980).
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons New York Chichester Brisbane Toronto (1981).
- DOBBIE, J.J., LAUDER, A.: Hydroxycodone: A New Alkaloid from Opium. *J. Chem. Soc.* 99 (1911) 34-35.
- DÖPKE, W., FLENTJE, H., JEFFS, P.W.: The Structures of Amurine and Nudaurine. *Tetrahedron* 24 (1968) 4459-4476.
- DONER, L.W., HSU, A.-F.: High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Alkaloids from Papaver somniferum on a Zorbax NH₂ Analytical Column. *J. Chromatog.* 253 (1982) 120-123.
- DUKE, J.A.: Utilization of Papaver. *Econ. Bot.* 27 (1973) 390-400.
- ECKERT, Z.G.: Die Technik des Radioimmunoassays. *Angew. Chem.* 88 (1976) 565-574.
- ELI LILLY & CO: Noralkaloids. *Neth. Appl.* 6,515,815 (CL.C07d) (1966).
- ENGLER, A.: Syllabus der Pflanzenfamilien II. Gebrüder Bornträger Berlin (1964).
- FAIRBAIRN, J.W., HAKIM, F.: Papaver bracteatum Lindl. - A New Plant Source of Opiates. *J. Pharm. Pharmac.* 25 (1973) 353-358.
- FAIRBAIRN, J.W., HELLIWELL, K.: The Determination of Thebaine in Papaver bracteatum Lindl. by Gas-Liquid Chromatography. *J. Pharm. Pharmac.* 27 (1975) 217-221.
- FAIRBAIRN, J.W.: New Plant Sources of Opiates. *Planta medica* 29 (1976) 26-31.
- FEDDE, F.: Papaveraceae - Hypecoideae et Papaveraceae - Papaveroidae. In: Das Pflanzenreich. Engler, A. (ed.). W. Engelmann Leipzig IV.104 (1909).

- FELDMANN, H., RODBARD, D.: Mathematical Theory of Radio-immunoassays. In: Principles of Competitive Protein Binding Assays. Odell, W.P., Daughaday, W.W. (eds.). Philadelphia (1971) 57.
- FINDLAY, J.W.A., BUTZ, R.F., WELCH, R.M.: A Codeine Radio-immunoassay Exhibiting Insignificant Cross-Reactivity with Morphine. *Life Sciences* 19 (1976) 389-394.
- FINDLAY, J.W.A., BUTZ, R.F., WELCH, R.M.: Specific Radio-immunoassays for Codeine and Morphine. Metabolism of Codeine to Morphine in the Rat. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* 17 (1977) 595-603.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.: *Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftsverlag (1977).
- FURUYA, T., IKUTA, A., SYONO, K: Alkaloids from Callus Tissue of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 11 (1972) 3041-3044.
- FURUYA, T., NAKANO, M., YOSHIKAWA, T.: Biotransformation of (R,S)-Reticuline and Morphinan Alkaloids by Cell Cultures of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 17 (1978) 891-893.
- FURUYA, T.: Production of Opium-Alkaloids by Tissue Culture of *Papaver*. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 8161,994 (CL.C12P17/18) (1981).
- FURUYA, T., YOSHIKAWA, T., TAIRA, M.: Biotransformation of Codeinone to Codeine by Immobilized Cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 23 (1984) 999-1001.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell. Res.* 50 (1968) 151-158.
- GATES, M., TSCHUDI, G.: The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1109-1110.
- GATES, M.: The Conversion of Codeinone to Codeine. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 4340-4341.
- GATES, M., TSCHUDI, G.: The Synthesis of Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 1380-1393.
- GINTZLER, A.R., MOHACSI, I., SPECTOR, S.: Radioimmunoassay for the Simultaneous Determination of Morphine and Codeine. *Eur. J. Pharmacol.* 38 (1976) 149-156.

- GOLDBLATT, P.: Biosynthetic Studies in Papaver Section Oxytona. Ann. Missouri Bot. Gard. 61 (1974) 264-296.
- GOPINATH, K.W., GOVINDACHARI, T.R., PAI, B.R., VISWANATHAN, N.: Konstitution von Retikulin, einem neuen Alkaloid aus Anona reticulata Linn. Chem. Ber. 92 (1959) 776-779.
- GOUGH, T.A., BAKER, P.B.: Identification of Major Drugs of Abuse Using Chromatography. J. Chrom. Sci. 20 (1982) 289-329.
- GRESSHOFF, P.M., DOY, C.H.: Development and Differentiation of Haploid Lycopersicum esculentum (Tomato). Planta 107 (1977) 161-170.
- GRIMAU, M.E.: Sur une Nouvelle Série de Bases Dérivées de la Morphine. Compt. rend. 93 (1881) 591-593.
- GRÜTZMANN, K.D., SCHRÖTER, H.-B.: Zur Umwandlung von Thebain in Gewebekulturen. Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol. 3 (1966) 347.
- GUBITZ, G., WINTERSTEIGER, R.: Identification of Drugs of Abuse by High Performance Thin Layer Chromatography J. Anal. Toxicol. 4 (1980) 141-144.
- GULLAND, J.M., ROBINSON, R.: Constitution of Codeine and Thebaine. Mem. Proc. Manchester Lit. Phil. Soc. 69 (1925) 79-86.
- HAHN, E.F., FISHMAN, J.H., FISHMAN, J.: High Sensitivity Solid Phase Exchange Radioimmunoassay for Morphine. J. Pharm. Pharmac. 31 (1979) 250-252.
- HAMMER, K., FRITSCH, R.: Zur Frage nach der Ursprungsart des Kulturmohns (Papaver somniferum L.). Kulturpflanze 25 (1977) 113-124.
- HELLER, R.: Recherches sur la Nutrition Minérales des Tissus Végétaux Cultivés in vitro. Ann. Nat. Bot. Biol. Veg. 14 (1953) 1-223.
- HINZ, H., ZENK, M.H.: Production of Protoberberine Alkaloids by Cell Suspension Cultures of Berberis Species. Naturwissenschaften 68 (1981) 620-621.
- HIRST, E.E., JONES, J.K.N., JONES, W.O.: The Structure of Alginic Acid. Part I. J. Chem. Soc. (1939) 1880-1885.
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Enzymic Reduction of Codeinone in vitro Cell-Free Systems from Papaver somniferum and Papaver bracteatum. Phytochemistry 19 (1980) 1681-1684.

- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Enzymic Conversion of Reticuline to Salutaridine by Cell-Free Systems of Papaver somniferum. Biochemistry 21 (1982a) 3729-3734.
- HODGES, C.C., RAPOPORT, H.: Morphinan Alkaloids in Callus Cultures of Papaver somniferum. J. Nat. Prod. 45 (1982b) 481-485.
- HOLMES, H.L., STORK, G.: The Morphine Alkaloids II. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F., Holmes, H.L. (eds.). Academic Press New York London 2 (1952) 162-218.
- HSU, A.-F., BROWER, D., ETSKOVITZ, R.B., CHEN, P.K., BILLS, D.D.: Radioimmunoassay for Quantitative Determination of Morphine in Capsules of Papaver somniferum. Phytochemistry 22 (1983) 1665-1669.
- HURN, B.A.L., LANDON, J.: Antisera for Radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay Methods. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.) London (1971) 121-142.
- HUTIN, M., COURTOIS, D., PETIARD, V., SYNTHELABO, L.E.R.: ; Do Alkaloids from Papaver somniferum Tissue Culture Need Specific Extraction Procedures? Symposium: "Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture". Gießen (1984).
- IKUTA, A., SYONO, K., FURUYA, T.: Alkaloids of Callus Tissues and Redifferentiated Plantlets in the Papaveraceae. Phytochemistry 13 (1974) 2175-2179.
- JEFFS, P.W.: The Protoberberine Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 9 (1967) 41-115.
- KABAY, J.: Production of Morphine by the Hungarian Procedure. Pharm. Monatsh. 11 (1930) 73-74.
- KALVODA, J., BUCHSCHACHER, P., JEGER, O.: Über die absolute Konfiguration des Morphins und verwandter Alkaloide. Helv. Chim. Acta 38 (1955) 1847-1856.
- KAMIMURA, S., AKUTSU, M., NISHIKAWA, M.: Formation of Thebaine in the Suspension Culture of Papaver bracteatum. Agr. Biol. Chem. 40 (1976) 913-919.
- KAMIMURA, S., NISHIKAWA, M.: Growth and Alkaloid Production of the Cultured Cells of Papaver bracteatum. Agr. Biol. Chem. 40 (1976) 907-911.

- KAMO, K.K., KIMOTO, W., HSU, A.-F., MAHLBERG, P.G., BILLS, D.D.: Morphinane Alkaloids in Cultured Tissues and Redifferentiated Organs of Papaver somniferum. Phytochemistry 21 (1982) 219-222.
- KHANNA, P., KHANNA, R., SHARMA, M.: Production of Free Ascorbic Acid and the Effect of Exogenous Ascorbic Acid and Tyrosine on the Production of Major Opium Alkaloids from an in vitro Tissue Culture of Papaver somniferum Linn. Indian J. Exp. Biol. 16 (1978) 110-112.
- KLEINSCHMIDT, G., MOTHES, K.: Zur Physiologie und Biosynthese der Alkaloide von Papaver somniferum. Z. Naturforsch. 14b (1959) 52-56.
- KLEINSCHMIDT, G.: Beiträge zur Physiologie der Mohnalkaloide. Die Demethylierung des Kodeins zum Morphin in der Mohnpflanze. Pharmazie 15 (1960) 663-664.
- KNUDSON, L.: A New Nutrient Solution for the Germination of Orchid Seeds. Am. Orchid Soc. Bull. 15 (1946) 214-217.
- KOLOSSA, E.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Inhaltsstoffen in Nicotiana-Pflanzen und Zellkulturen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1983).
- KROEBER, L.: Zur Frage der Opiumgewinnung und Morphinerzeugung in Deutschland. Pharmazie 1 (1946) 314-318.
- KUBECZKA, K.-H.: Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Drogen- und Naturstoffanalyse. In: Biogene Arzneistoffe. Czygan, F.-C. (ed.) Vieweg Verlag Braunschweig (1984) 239-258.
- KÜHN, L., PFEIFER, S.: Die Gattung Papaver und ihre Alkaloide. Pharmazie 18 (1963) 819-843.
- KUTAL, C.: Chiral Shift Reagents. In: Nuclear Magnetic Resonance Shift Reagents. Siewers, R.E. (ed.). Academic Press New York London (1973).
- KUTCHAN, T.M., AYABE, S., KRUEGER, R.J., COSCIA, E.M., COSCIA, C.J.: Cytodifferentiation and Alkaloid Accumulation in Cultured Cells of Papaver bracteatum. Plant Cell Reports 2 (1983) 281-284.
- LALEZARI, I., NASSERI, P., ASGHARIAN, R.: Papaver bracteatum Lindl.: Population Arya II. J. Pharm. Sci. 63 (1974) 1331.

- LALEZARI, I., SHAFIEE, A., MAHJOUR, M.: Major Alkaloids of Glaucium flavum Grantz, Population Ghom. J. Pharm. Sci. 65 (1976) 923-924.
- LAURENT, M.A.: Sur la Composition des Alcalis Organiques et de quelques Combinaisons Azotées. Ann. Chim. Phys. 19 (1847) 359-377.
- LAVIE, D., ROTMAN, J., LEVY, A., PALEVITCH, D.: A Rapid Quantitative Method for the Determination of Thebaine in Papaver bracteatum. Phytochemistry 18 (1979) 2011-2013.
- LEETE, E.: Biogenesis of Morphine. Chem. Ind. (London) (1958) 977-978.
- LEETE, E.: The Biogenesis of Morphine. J. Am. Chem. Soc. 81 (1959) 3948-3951.
- LEETE, E., MURRILL, S.J.B.: The Incorporation of Dopamine into Chelidonine and Morphine. Tetrahedron Lett. 3 (1964) 147-151.
- LEHTÖLA, T., HUHTIKANGAS, A., VIRTANEN, R.: Application of Radioimmunoassay to the Quantitation of Hyoscyamin in Plant Material. Planta Medica 45 (1982) 237-239.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 18 (1965) 100-127.
- LÜBKE, K., NIEUWEBOER, B.: Immunologische Tests für niedermolekulare Wirkstoffe. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1978).
- MACKAY, M., HODGKIN, D.C.: A Crystallographic Examination of the Structure of Morphine. J. Chem. Soc. (1955) 3261-3267.
- MAGHSSOUDI, R.H., FAWZI, A.B.: Direct Spectrophotometric Determination of Thebaine in Arya II Population Capsules of Papaver bracteatum Lindl. J. Pharm. Sci. 67 (1978) 32-34.
- MANSELL, R.L., WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for the Determination of Limonin in Citrus. Phytochemistry 19 (1980) 1403-1407.
- MANSKE, R.H.F., ASHFORD, W.R.: The Protoberberine Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press New York London 4 (1954) 77-118.

- MERCK, G.: Vorläufige Notiz über eine neue organische Base im Opium. Ann. Chem. 66 (1848) 125-128.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 16 (1962) 473-497.
- NESSLER, C.L.: Somatic Embryogenesis in the Opium Poppy, Papaver somniferum. Physiol. Plant. 55 (1982) 453-458.
- NEUBAUER, D., MOTHES, K.: Über Papaver bracteatum. 1. Mitteilung: Ein neuer Weg zur Gewinnung von Morphinanen auf pflanzlicher Rohstoffbasis. Planta medica 11 (1963) 387-391.
- NIELSEN, B., ROE, J., BROCHMANN-HANSEN, E.: Oripavine - A New Opium Alkaloid. Planta medica 48 (1983) 205-206.
- NITSCH, J.P., NITSCH, C.: Haploid Plants from Pollen Grains. Science 163 (1969) 85-87.
- NOBUHARA, Y., HIRANO, S., NAMBA, K., HASHIMOTO, M.: Separation and Determination of Opium Alkaloids by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromat. 187 (1980) 251-255.
- NYMAN, U., BRUHN, J.G.: Papaver bracteatum - a Summary of Current Knowledge. Planta medica 35 (1979) 97-114.
- OLIVER, G.C., PARKER, B.M., BRASFIELD, D.L., PARKER, C.W.: The Measurement of Digitoxin in Human Serum by Radioimmunoassay. J. Clin. Invest. 47 (1968) 1035-1042.
- PARKER, H.I., BLASCHKE, G., RAPOPORT, H.: Biosynthetic Conversion of Thebaine to Codeine. J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 1276-1282.
- PELLETIER, J.: Neue Untersuchungen, die Geschichte und die näheren Bestandteile des Opiums betreffend. Ann. 16 (1835) 27-54.
- PFEIFER, S.: Mohn - Eine Arzneipflanze seit mehr als zweitausend Jahren. 1. Teil. Pharmazie 17 (1962a) 467-479.
- PFEIFER, S.: Mohn - Eine Arzneipflanze seit mehr als zweitausend Jahren. 2. Teil. Pharmazie 17 (1962b) 536-554.
- PFEIFER, S., MANN, I.: Alkaloids of the Genus Papaver. Abh. Deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol. 3 (1966) 315-317.

- PFITZNER, U.: Die Strictosidin-Synthase aus Catharanthus roseus Zellkulturen: Reinigung, Immunologische Charakterisierung und Immobilisierung eines Enzyms aus dem Sekundärstoffwechsel. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- PHILLIPSON, J.D.: Members of the Miltanthe Section of Papaver as a Source of Morphinan Alkaloids. J. Pharm. Pharmacol. 25 (1973) 113.
- PHILLIPSON, J.D., SARIYAR, G., BAYTOP, T.: Alkaloids from Papaver fugax of Turkish origin. Phytochemistry 12 (1973) 2431-2434.
- PHILLIPSON, J.D., SCUTT, A., BAYTOP, A., ÖZHATAY, N., SARIYAR, G.: Alkaloids from Turkish Samples of Papaver orientale und P. pseudo-orientale. Planta medica 43 (1981a) 261-271.
- PHILLIPSON, J.D., THOMAS, O.O., GRAY, A.I., SARIYAR, G.: Alkaloids from Papaver armeniacum, P. fugax and P. tauricola. Planta medica 41 (1981b) 105-118.
- PHILLIPSON, J.D.: Chemical Investigations of Herbarium Material for Alkaloids. Phytochemistry 21 (1982) 2441-2456.
- PHILLIPSON, J.D.: Intraspecific Variation and Alkaloids of Papaver Species. Planta medica 48 (1983) 187-192.
- PILWAT, G., WASHAUSEN, P., KLEIN, J., ZIMMERMANN, U.: Immobilization of Human Red Blood Cells. Z. Naturforsch. 35 (1980) 352-356.
- PREININGER, U.: The Pharmacology and Toxicology of the Papaveraceae Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 15 (1975) 207-261.
- RAPOPORT, H., STERMITZ, F.R., BAKER, D.R.: The Biosynthesis of Opium Alkaloids. I. The Interrelationship among Morphine, Codeine and Thebaine. J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 2765-2772.
- REINERT, J.: Morphogenesis and its Control on Tissue Cultures of Carrots. Naturwissenschaften 45 (1958) 344-345.
- REINHARD, E., ALFERMANN, A.W.: Biotransformation by Plant Tissue Cultures. In: Advances in Biochemical Engineering Plant Cell Cultures. Fischer, C.A. (ed.) 16 (1980) 49-83.

- RICE, K.C., BROSSI, A.: Expedient Synthesis of Racemic and Optically Active N-Norreticuline and N-Substituted and 6'-bromo-N-Norreticulines. *J. Org. Chem.* 45 (1980) 592-601.
- RINGE, F.: Förderung der Zellproliferation unter der Einwirkung von 2-Chloräthylenphosphorsäure bei Explantaten von *Begonia X richmondensis* in steriler Kultur. *Z. Pflanzenphysiol.* 76 (1972) 462-466.
- ROBINSON, R.: *The Structural Relations of Natural Products.* Oxford University Press (1955).
- ROBIQUET, M.: Sur le Mémoire de M. Sertuerner, Relatif à l'Analyse de l'Opium. *Ann. Chim. Phys.* 5 (1817) 275-288.
- ROBIQUET, M.: Nouvelles Observations sur les Principaux Produits de l'Opium. *Ann. Chim. Phys.* 51 (1832) 225-267.
- RODBARD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L.: Rapid Calculation of Radioimmunoassay Results. *J. Lab. Clin. Med.* 74 (1969) 770-781.
- RÜFFER, M., EL-SHAGI, H., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: (S)-Norlaudanosoline Synthase: the First Enzyme in the Benzyloisoquinoline Biosynthetic Pathway. *FEBS Lett.* 129 (1981) 5-9.
- RÜFFER, M., EKUNDAYO, O., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: Biosynthesis of the Protoberberine Alkaloid Jatrorrhizine. *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 2643-2644.
- SANKAWA, U., SUNG, C.K., HAN, B.H., AKIYAMA, T., KAWASHIMA, K.: Radioimmunoassay for the Determination of Ginseng Saponin, Ginsenosid RG1. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 1907-1910.
- SANTAVY, F.: Zur Biogenese der Mohnalkaloide und deren Ausnutzung für die Systematik der Pflanzen der Gattung Papaver. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 27 (1962) 1717-1720.
- SANTAVY, F.: *Papaveraceae Alkaloids.* In: *The Alkaloids.* Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 12 (1970) 333-454.
- SANTAVY, F.: *Papaveraceae Alkaloids II.* In: *The Alkaloids.* Manske, R.H.F., Rodrigo, R.G.A. (eds.). Academic Press New York London 17 (1979) 385-545.

- SCATCHARD, G.: The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660-672.
- SCHOPFER, P.: Experimente zur Pflanzenphysiologie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1976) 195.
- SCHUCHMANN, R., WELLMANN, E.: Somatic Embryogenesis of Tissue Cultures of Papaver somniferum and Papaver orientale and Its Relationship to Alkaloid and Lipid Metabolism. PlantCellReports 2 (1983) 88-91.
- SCHULTZE-MOTEL, J.: Die urgeschichtlichen Reste des Schlafmohns (Papaver somniferum L.) und die Entstehung der Art. Kulturpflanze 27 (1979) 207-215.
- SCHUNACK, W., MAYER, K., HAAKE, M.: Arzneistoffe. Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. Vieweg Verlag Braunschweig Wiesbaden (1983).
- SCHWARZ, M.A., MAMI, I.S.: A Biogenetically Patterned Synthesis of the Morphin Alkaloids. J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 1239-1240.
- SEIGLER, D.S.: Plant Systematics and Alkaloids. In: The Alkaloids. Manske, R.H.F. (ed.). Academic Press New York London 16 (1977) 1-82.
- SERTÜRNER, F.W.A.F.: Über das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandteil des Opiums. Ann. Phys. 25 (1817) 56-90.
- SHAFIEE, A., LALEZARI, I., YASSA, N.: Thebaine in Tissue Culture of Papaver bracteatum Lindl., Population Arya II. Lloydia 39 (1976) 380-381.
- SHAFIEE, A., LALEZARI, I., LAJEVARDI, S., KHALAFI, F.: Alkaloids of Glaucium flavum Grantz Populations Isfahan and Kazerun. J. Pharm. Sci. 66 (1977) 873-874.
- SHAFIEE, A., LALEZARI, I., YASSA, N.: Production of Thebaine in Tissue Cultures of Papaver bracteatum. U.S. Patent 4,114,314 (CL 47-85) (1978).
- SHAFIEE, A., GHANBARPOUR, H.: Alkaloids of Papaver Genus. XI. Alkaloids of Glaucium vitellinum Population Isfahan. J. Nat. Prod. 42 (1979) 174-178.
- SLAVIK, J.: Occurrence of Morphine as a Minor Alkaloid in Papaver decaisnei Hochst. Collect. Czech. Chem. Commun. 45 (1980) 2706-2709.

- SMITH, D.W., BEASLEY, T.H., CHARLES, R.L., ZIEGLER, H.W.: Quantitative Determination of Thebaine in Poppy Plants Using High Speed Liquid Chromatography. J. Pharm. Sci. 62 (1973) 1691-1694.
- SOHAR, P., SCHOENEWALDT, E.F.: Thebaine. U.S. Patent 3,894,026 (1975).
- SPÄTH, E., MOSETTIG, E., TRÖTHANDL, O.: Zur Kenntnis der Alkaloide von Corydalis cava. Chem. Ber. 56 (1923) 875-879.
- SPECTOR, S., PARKER, C.W.: Morphine Radioimmunoassay. Science 168 (1970) 1347-1348.
- SPECTOR, S., BERKOWITZ, B., FLYNN, E.J., PESKAR, B.: Antibodies to Morphine, Barbiturates and Serotonin. Pharmacol. Rev. 25 (1973) 281-291.
- SPECTOR, S.: Application of Radioimmunoassay to Pharmacology. Clin. Pharmacol. Ther. 16 (1974) 149-154.
- SPEYER, E., WALTHER, L.: Über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Morphin und seine Derivate. Chem. Ber. 63 (1930) 852-855.
- STABA, E.J., ZITO, S., AMIN, M.: Alkaloids Production from Papaver Tissue Cultures. J. Nat. Prod. 45 (1982) 256-262.
- STEFFENS, P.: Reinigung und Charakterisierung des Berberinbrückenenzym aus Zellkulturen von Berberis beaniana Schneid. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- STEFFENS, P., NAGAKURA, N., ZENK, M.H.: The Berberine Bridge Forming Enzyme in Tetrahydroprotoberberine Biosynthesis. Tetrahedron Lett. 25 (1984) 951-952.
- STERMITZ, F.R., RAPOPORT, H.: O-Demethylation as a Biosynthetic Pattern in the Formation of Opium Alkaloids. Nature 189 (1961a) 310-311.
- STERMITZ, F.R., RAPOPORT, H.: The Biosynthesis of Opium Alkaloids. Alkaloid Interconversions in Papaver somniferum and P. orientale. J. Am. Chem. Soc. 83 (1961b) 4045-4050.
- STERMITZ, F.R.: Alkaloid Chemistry and the Systematics of Papaver and Argemone. Rec. Adv. Phytochem. 1 (1968) 161-183.

- STEWART, F.C., MAPES, M.O., MEARS, K.: Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. Am. J. Bot. 45 (1958) 705-708.
- STUART, K.L., CHAMBERS, C.: Flavinine, a New Morphinandienone Alkaloid from Croton flavens L. Tetrahedron Lett. 30 (1967) 2879-2882.
- STUART, K.L., CHAMBERS, C., BYFIELD, D.: Morphinandienone Alkaloids from Croton flavens L. J. Chem. Soc. C (1969) 1681-1684.
- STUART, K.L., WOO-MING, R.B.: Alkaloids from Croton plumieri. Phytochemistry 8 (1969) 777-780.
- STUART, K.L.: Morphinandienone Alkaloids. Chem. Rev. 71 (1971) 47-72.
- SUND, C.: Bestimmung von Papaver-Alkaloiden und Pflanzen-selektion mittels Radioimmunoassay. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1978).
- SZÁNTAY, C., BLASKO, G., BARCZAI-BOKE, M., DÖRNYEI, G., PECHY, P.: Studies on the Synthesis of Morphine. VI. Recent Progress on the Biomimetic Synthesis of Morphine. Planta medica 48 (1983) 207-211.
- TAKATA, I., TOSA, T., CHIBATA, I.: Screening of Matrix Suitable for Immobilization of Microbial Cells. J. Solid-Phase Biochem. 2 (1977) 225-236.
- TAM, W.H.J., CONSTABEL, F., KURZ, W.G.W.: Codeine from Cell Suspension Cultures of Papaver somniferum. Phytochemistry 19 (1980) 486-487.
- TAM, W.H.J., KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F., CHATSON, K.B.: Biotransformation of Thebaine by Cell Suspension Cultures of Papaver somniferum cv. Marianne. Phytochemistry 21 (1982) 253-255.
- TROJANEK, J., KAVKA, F., VIT, J., CEKAN, Z.: Isolierung von Morphin aus Mohnkapseln. Untersuchungen zur Extraktion von Morphin aus Mohnkapseln. Pharmazie 20 (1965) 172-175.
- VELICKY, J.A., MARTIN, S.M.: A Fermenter for Plant Cell Suspension Cultures. Can. J. Microbiol. 16 (1969) 223-226.

- VENT, W., RÄNDEL, U., WENDT, W.: Beiträge zur Kenntnis der Sippenstruktur von Papaver atlanticum (Ball)Coss. und Papaver rupifragum Boiss. & Reut. Feddes Rep. 77 (1968) 47-56.
- VINCENT, P.G., GENTNER, W.A., KÜPPERS, F.J.E.M., SALEMINK, C.A.: Papaver bracteatum Lindl.: Quantitative Extraction and Determination of Thebaine. J. Pharm. Sci. 68 (1979) 87-89.
- WAINER, B.H., FITCH, F.W., FRIED, J., ROTHBERG, R.M.: Measurements of the Specificities of Antibodies to Morphine-6-Succinyl-BSA (Bovine Serum Albumin) by Competitive Inhibition of (¹⁴C)Morphine Binding. J. Immunol. 110 (1973) 667-673.
- WAINER, B.H., FITCH, F.W., FRIED, J., ROTHBERG, R.M.: Immunochemical Studies of Opioids. Specificities of Antibodies Against Codeine and Hydromorphone. Clin. Immunol. Immunopath. 3 (1974) 155-170.
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and Related Compounds in Digitalis lanata. Phytochemistry 15 (1976) 1537-1545.
- WEILER, E.W.: Die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin und verwandten Verbindungen in Digitalis lanata Ehrh. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1977).
- WEILER, E.W., KRÜGER, H., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Steroidal Alkaloid Solasodine and Related Compounds in Living Plants and Herbarium Specimens. Planta medica 39 (1980) 112-124.
- WEILER, E.W., STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Scopolamine. Phytochemistry 20 (1981) 2009-2016.
- WESTEKEMPER, P., WIECZOREK, U., GUERITTE, N., LANGLOIS, N., LANGLOIS, Y., POTIER, P., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Indole Alkaloid Vindoline in Catharanthus. Planta medica 39 (1980) 24-37.
- WHITE, P.R.: Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. Am. J. Bot. 26 (1939) 59-64.
- WINTERSTEIN, E., TRIER, G.: Die Alkaloide - Eine Monographie der natürlichen Basen. Gebr. Bornträger Berlin (1910).

- WRIGHT, C.R.A.: On the Action of Organic Acids and their Anhydrides on the Natural Alkaloids. Part I. J. Chem. Soc. 27 (1874) 1031-1043.
- ZENK, M.H.: Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung. In: Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin. Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte. 112. Versammlung Mannheim 1982. Staab, H.A., Gerok, W., Markl, H., Martienssen, W., Gibian, H. (eds.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1982) 145-162.
- ZENK, M.H., DEUS, B.: Natural Products Synthesis by Plant Cell Cultures. Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture (1982) 391-393.
- ZITO, S.W., STABA, E.J.: Thebaine from Root Cultures of Papaver bracteatum. Planta medica 45 (1982) 53-54.

D a n k s a g u n g

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, der mir das Thema der vorliegenden Arbeit freundlicherweise überließ, danke ich sehr herzlich für seine ständige Anteilnahme am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen.

Ebenfalls gilt mein Dank allen denen, die mit Rat und Tat zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, sei für die finanzielle Unterstützung gedankt. Empfänger der Finanzmittel war Prof. Dr. M. H. Zenk.

L e b e n s l a u f

Am 15. Februar 1956 wurde ich, Ute Wieczorek, als Tochter des technischen Angestellten Günter Wieczorek und seiner Ehefrau Helga, geb. Miasterek, in Bochum geboren.

In den Jahren 1962 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in Bochum-Stiepel und trat anschließend in das Schiller-Gymnasium in Bochum ein. Dort legte ich im Juni 1974 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium zunächst der Geologie, dann ab Wintersemester 1976/77 der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum auf. Im April 1980 legte ich die Diplom-Hauptprüfung im Fach Biologie ab und begann im Mai 1980 unter der Anleitung von Prof. Dr. M. H. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Vom Mai bis Dezember 1980 war ich als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum, seit Januar 1981 am Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians- Universität München tätig.

